

**Synthese neuartiger Thrombinhemmstoffe zur Entwicklung
gerinnungshemmender Liposomen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

vorgelegt von

Dipl. Chemiker Wegderes Endreas

aus Addis Abeba/Äthiopien

Marburg/Lahn 2016

Eingereicht am **06.06.2016**

Tag der mündlichen Prüfung am **18.07.2016**

Erstgutachter: Prof. Dr. Torsten Steinmetzer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Udo Bakowsky

Hochschulkennziffer: 1180

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Torsten Steinmetzer am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von März 2012 bis August 2015 durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Syntheschemen	XI
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Peptide als Wirkstoffe – ihre wachsende Bedeutung	1
1.2 Strategien zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit	3
1.2.1 Chemische Modifikation	3
1.2.2 Fusion der Peptide mit Plasmaproteinen oder Polymeren	4
2 Liposomen.....	9
2.1 Physikochemische Eigenschaften der Liposomen	12
2.2 Wechselwirkungen der Liposomen mit Zellen	13
2.3 Liposomen als Arzneimittelträger – der Weg von konventionellen Liposomen zu Stealth-Liposomen	14
2.4 Liposomen-Konjugate für spezifisches Targeting	17
2.5 Herstellung der Liposomen mit der Filmmethode	19
3 Blutgerinnung.....	21
3.1 Struktur des Thrombins	24
3.2 Regulation der Blutgerinnung.....	25
3.3 Proteaseinhibitoren zur Gerinnungshemmung	26
3.3.1 Indirekte Antikoagulantien.....	26
3.3.2 Parenterale Thrombininhibitoren	27
3.3.3 Direkte orale Antikoagulantien (DOAK)	29
4 Zielsetzung der Arbeit	31
5 Ergebnisse und Diskussion.....	33
5.1 Synthesen	33
5.1.1 Synthese der Inhibitoren mit L-Aminosäuren in P3-Position (Typ I)	33

5.1.2 Substratanaloge Inhibitoren mit D-Cha in P3-Position (Typ II)	35
5.1.2.1 Inhibitoren mit aromatischen Sulfonylresten.....	35
5.1.2.2 Inhibitoren mit aliphatischen Sulfonylresten.....	36
5.2 Enzymkinetische Messungen	38
5.2.1 Hemmwirkung der Typ I Inhibitoren.....	38
5.2.2 Hemmwirkung der Typ II Inhibitoren	40
5.3 Herstellung der gerinnungshemmenden Liposomen	42
5.4 Physikochemische Charakterisierung der Liposomen.....	44
5.5 Thrombinhemmwirkung der Liposomen	46
5.6 Gerinnungshemmung im Plasma.....	50
5.7 Neutralisierung der Thrombinhemmwirkung der DPPC/CH/10/21-Liposomen durch Avidin.....	51
5.8 SPR-Bindungsstudien.....	53
5.9 Kovalente Oberflächenfunktionalisierung.....	58
6 Zusammenfassung und Ausblick	61
7 Experimenteller Teil.....	65
7.1 Materialien und Methoden	65
7.1.1 Verwendete Materialien.....	65
7.1.2 Dünnschichtchromatographie	65
7.1.3 Präparative Säulenchromatographie	66
7.1.4 HPLC	66
7.1.5 Lyophilisierung	67
7.1.6 NMR-Spektroskopie	67
7.1.7 Massenspektrometrie	67
7.2 Enzymkinetische Messungen	68
7.3 Bestimmung der IC ₅₀ -Werte.....	70
7.4 Gerinnungsmessungen in Plasma	71
7.5 Neutralisierung der Thrombinhemmwirkung durch Avidin.....	71
7.6 Herstellung der antikoagulanten Liposomen.....	72
7.7 Physikochemische Charakterisierung der Liposomen.....	73
7.7.1 Dynamische Lichtstreuung	73
7.7.2 Laser-Doppler-Anemometrie (LDA)	73

7.7.3 Raster-Kraft-Mikroskopie	73
7.8 Beschichtung von Glasplatten mit Thrombinhemmstoffen und Bestimmung der Hemmwirkung	74
7.9 Synthese	76
7.9.1 Synthese des P2-P1-Segments H-Pro-4-Amba \times 2 HCl	76
7.9.2 Synthese der Inhibitoren mit L -Aminosäuren in P3-Position.....	79
7.9.3 Synthese von CH ₃ -(CH ₂) ₁₄ -CO-Tota-Biotin (MI-908)	92
7.9.4 Inhibitoren mit D-Aminosäuren in P3-Position.....	94
 Literaturverzeichnis	 111
Veröffentlichungen	132
Anhang.....	133
Danksagung.....	149
Erklärung	151

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Strategien zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit von Proteinen.	3
Abbildung 2.	Strukturen albuminbindender Moleküle.	5
Abbildung 3.	Konjugation von Proteinen und Peptiden mit Polymere.....	6
Abbildung 4.	Schematische Darstellung von Phospholipiden und deren räumliche Anordnung in Vesikeln.	10
Abbildung 5.	Schematischer Aufbau eines Phospholipids	10
Abbildung 6.	Schematische Darstellung der temperaturabhängigen Änderung der Packung der Acylketten in einer Phospholipidmembran.....	12
Abbildung 7.	Chemische Struktur der DSPE-mPEG.....	16
Abbildung 8.	Konjugation von Liganden an PEG-Liposomen.....	17
Abbildung 9.	Spezifische kovalente Verknüpfung von Thiolen an geeignete Kopfgruppen der Phospholipide auf Liposomenoberfläche.	18
Abbildung 10.	Sulfhydrierung von Proteinen.	19
Abbildung 11.	Schematische Darstellung der primären Hämostase.....	22
Abbildung 12.	Schematische Darstellung des Gerinnungs- und Fibrinolyse-systems.	23
Abbildung 13.	Stereodarstellung des Thrombins im Komplex mit dem Hexapeptidsubstrat IAGRSL	24
Abbildung 14.	Strukturen einiger synthetischer Thrombininhibitoren.....	28
Abbildung 15.	Kristallstruktur des Inhibitors 3-Cl-4-MeO-Bs-Asn(4-CN-Bzl)-Pro-4-Amba im Komplex mit humanem Thrombin	29
Abbildung 16.	Thrombininhibitoren des Typs 4-MeO-Bs-L-Lys/Asp-Pro-4-Amba (Typ I) und des Typs P4-D-Cha-Pro-4-Amba (Typ II).	31
Abbildung 17.	Schematische Darstellung eines bifunktionalisierten Liposoms.....	43
Abbildung 18.	AFM-Bilder der Lipidformulierungen.	45

Abbildung 19.	Thrombinhemmwirkung der mono- und bifunktionalisierten Liposomen mit den Thrombininhibitoren 10 oder 12	48
Abbildung 20.	Thrombinhemmung der monofunktionalisierten Liposomen der Zusammensetzung DPPC/CH/ 37 und DPPC/CH/ 45	49
Abbildung 21.	FXa-Hemmwirkung der DPPC/CH/ 37 und DPPC/CH/ 45 Liposomen.....	49
Abbildung 22.	Gerinnungshemmung freier Inhibitoren und ausgewählter Liposomen im aPTT-Test	50
Abbildung 23.	Absenkung der Thrombinhemmwirkung durch Zugabe von Avidin	53
Abbildung 24.	Schematischer Aufbau des SPR-Experiments mit dem Inhibitor 11	55
Abbildung 25.	Sensogramme der SPR-Bindungsstudien mit den bifunktionalisierten Liposomen.	56
Abbildung 26.	Sensogramme der SPR-Bindungsstudien mit dem biotinylierten Inhibitor 11	56
Abbildung 27.	Thrombinhemmung der mit dem Thrombinhemmstoff 9 kovalent beschichteten Gläser.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Struktur und Eigenschaften synthetischer Phospholipide mit membranbildenden Eigenschaften.	11
Tabelle 2.	Hemmwirkung der Inhibitoren mit Lys in P3-Position	39
Tabelle 3.	Hemmwirkungen der Inhibitoren mit Asp bzw. Asn in P3-Position	40
Tabelle 4.	Hemmwirkung der Inhibitoren mit aromatischen Sulfonylresten in P4- und D-Cha in P3-Position.	41
Tabelle 5.	Hemmwirkungen der Inhibitoren mit aliphatischen Sulfonylresten in P4- und D-Cha in P3- Position.	42
Tabelle 6.	Zusammensetzung, Partikelgröße und Zetapotential der hergestellten Liposomen.	44
Tabelle 7.	Zusammensetzung, Thrombin- und FXa-Hemmung sowie Gerinnungshemmung der hergestellten Liposomen	47
Tabelle 8.	Verwendete Enzyme und Substrate	69
Tabelle 9.	Messansatz zur Bestimmung der Hemmkonstanten mit AMC-Substraten.....	70

Syntheseschemen

Schema 1.	Synthese der Inhibitoren vom Typ-I mit L-Lys in P3 (7 und 9-12)	33
Schema 2.	Synthese der Inhibitoren vom Typ-I mit Asp/Asn in P3-Position (15 und 17-19).....	34
Schema 3.	Synthese des palmitoylierten Biotinderivats 21	34
Schema 4.	Synthese der Inhibitoren 25-26 und 28-29 mit D-Cha in P3 Position und aromatischen Sulfonylresten	36
Schema 5.	Synthese der Inhibitoren 41-42 und 44-45 mit D-Cha in P3-Position und aliphatischen Sulfonylresten	37

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen für Aminosäuren und deren Derivate werden den Empfehlungen der *IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)* und des *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)* entsprechend verwendet. Sie werden im Drei- oder im Ein-Buchstaben-Code angegeben.^[1] Alle Aminosäuren und ihre Derivate liegen in L-Konfiguration vor, andernfalls wird dies ausdrücklich gekennzeichnet. Abkürzungen für chemische Verbindungen sind aus den einschlägigen Nachschlagewerken *Methods of organic chemistry* (Houben-Weyl), *March's Advanced organic chemistry* und *Greene's Protective groups in organic synthesis* übernommen.

4-Amba	4-(Amidino)benzylamin/-id
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
ACN	Acetonitril
Adoa	8-(Amino)-3,6-dioxa-octansäure
AFM	Atomic force microscopy
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
Äquiv.	Äquivalent(e)
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc-Tota-H	1-(Boc-amino)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamin
BOP	Benzotriazolyl-oxytris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat
Bs	Benzensulfonyl
BSA	Rinderserum-Albumin
Bzls	Benzylsulfonyl

^[1] <http://www.pharmtech.com/peptides-gain-traction-drug-development>.

Cbz	Benzyloxycarbonyl
CH	Cholesterol
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
D-Cha	D-Cyclohexylalanin
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin, Hünig-Base
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
EtOAc	Essigsäureethylester
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
gef.	gefunden
HWZ	Halbwertszeit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC_{50}	mittlere inhibitorische Konzentration (50 % Hemmung)
kDa	Kilodalton
K_i	Inhibitorkonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
MeOH	Methanol
n.b.	nicht bestimmt
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDP-PEG-PE	Pyridyldithiopropionylamino-PEG-phosphatidylethanolamin
PE	Phosphatidyl-Ethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PL	Phospholipid
RT	Raumtemperatur
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
<i>tert</i> -BuOH	<i>tert</i> -Butanol
T_m	Phasenübergangstemperatur
Tota	1-(Amino)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit des Enzym

1 Einleitung

1.1 Peptide als Wirkstoffe – ihre wachsende Bedeutung

Peptide besitzen häufig eine bemerkenswerte Spezifität und eine hochwirksame biologische Aktivität. Aufgrund ihrer Zusammensetzung aus körpereigenen Aminosäuren kommt es nur selten zu toxischen Nebenwirkungen durch ihre Metabolisierung oder ihren Abbau. Daher wurden peptidartige Wirkstoffe vor allem für solche Anwendungen entwickelt, bei denen niedermolekulare synthetische Moleküle infolge toxischer Metabolitenbildung und zu geringer Spezifität als Arzneimittel nicht in Frage kommen. Mit Beginn der 1980er Jahre wurde die Entwicklung von Peptidtherapeutika intensiviert [1]. Jedoch sind viele der damals geprüften „Wirkstoffkandidaten“ trotz vielversprechender pharmakologischer Wirksamkeit in präklinischen Untersuchungen in der weiteren Entwicklung aufgrund unzureichender klinischer Effekte gescheitert [1]. So müssen Peptide in der Regel parenteral appliziert werden, da sie von proteolytischen Enzymen im Verdauungstrakt rasch abgebaut werden. Außerdem werden sie in der Regel wegen ihrer polaren und hydrophilen Eigenschaften nach oraler Gabe nicht resorbiert [2, 3]. Ein weiteres Problem ist oftmals die kurze Plasmahalbwertszeit, die häufig nur im Bereich von wenigen Minuten liegt. Jedoch gibt es auch Peptide, die deutlich längere Halbwertszeiten bis zu einigen Stunden besitzen. Die kurze Plasmahalbwertszeit beruht häufig auf einer raschen Eliminierung der Peptide über die Niere. Diese Elimination ist wiederum auf die hydrophilen Eigenschaften und auf die oft zu geringen Molekülgrößen der peptidischen Verbindungen zurückzuführen. Hinzu kommt der rasche Abbau durch zahlreiche Enzyme, die in Blut, Leber und Niere vorkommen [4, 5]. Dadurch wird der therapeutische Nutzen peptidischer Wirkstoffe erheblich eingeschränkt, und es sind wiederholte Injektionen in kurzen Zeitabständen notwendig. Darüber hinaus sind hohe Dosierungen erforderlich, um den notwendigen Wirkstoffspiegel am Wirkort zu gewährleisten. Dies führt im Vergleich mit kleinmolekularen Wirkstoffen zu höheren Kosten. Zudem können durch die erhöhten Konzentrationen auch verstärkt toxische Nebenwirkungen ausgelöst werden. Um diese Nachteile zu kompensieren, wurden zahlreiche Strategien zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit entwickelt und in der Praxis erfolgreich eingesetzt. Dazu gehört unter anderem die Konjugation der Peptide mit langlebigen Plasmaproteinen oder Polymeren, um ihre renale Filtration zu reduzieren.

Aufgrund neuer Erkenntnisse zu solchen halbwertszeitverlängerenden Maßnahmen haben Peptide in letzter Zeit wieder an Bedeutung gewonnen. Die Fortschritte in der rekombinanten Proteinexpressionstechnologie sowie die Entwicklung von effizienteren und wirtschaftlicheren Peptidsynthese-, Reinigungs- und Analysemethoden sind weitere Gründe für die Renaissance der Peptidwirkstoffe. Etwa 85 % der therapeutisch eingesetzten Peptide werden synthetisch und die restlichen 15 % mittels rekombinanter Technologien hergestellt [1]. Im Gegensatz zu den niedermolekularen Wirkstoffen entfällt auf peptidbasierte Wirkstoffe derzeit lediglich ein Marktanteil von 2 % [6], jedoch sind in den letzten zehn Jahren die Zulassungen deutlich gestiegen. Allein im Jahr 2012 kamen sechs Peptidwirkstoffe in den USA auf den Markt, fünf davon wurden auch in Europa zugelassen [7]. Lixisenatid, ein *Glucagon-like Peptide 1*-Analogon aus 44 Aminosäuren, wurde im Jahr 2013 zur Behandlung von Diabetes Typ 2 zugelassen. Der Melanocortin-Rezeptor-Agonist Afamelantoid (Scenesse®), ein synthetisches Peptidhormon bestehend aus dreizehn Aminosäuren, erhielt im Jahr 2014 von der Europäischen Arzneimittelbehörde (European Medicines Agency, EMA) eine Zulassungsempfehlung zur Behandlung der Erythropoetischen Protoporphyririe (EPP). Diese seltene erbliche Krankheit führt zu einer äußerst schmerzhaften Sonnen-Lichtempfindlichkeit (Photodermatose) [8]. Momentan gibt es mehr als 60 von der US-amerikanischen Lebens- und Arzneimittelbehörde FDA zugelassene peptidische Wirkstoffe auf dem Markt [2]. Viele dieser Peptide sind Hormone oder Derivate, welche Hormonwirkungen stimulieren. Sie werden intravenös, subkutan oder inhalativ verabreicht. Zu den erfolgreichsten Peptidmedikamenten mit einem Jahresumsatz von insgesamt mehreren Milliarden Dollar zählen Zoladex, Lupron und Sandostatin [6]. Die Anzahl zugelassener Peptide wird in den nächsten Jahren weiter ansteigen, da derzeit ca. 140 Peptidwirkstoffe in der klinischen und mehr als 500 therapeutische Peptide in der präklinischen Entwicklung sind. Aktuell befinden sich rund ein Dutzend Peptidwirkstoffe in der klinischen Phase III [2, 9]. Die meisten dieser „Entwicklungskandidaten“ sollen vorwiegend zur Behandlung von Krebs, zur Therapie von kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen sowie zur Bekämpfung von Infektionen dienen [7].

1.2 Strategien zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit

1.2.1 Chemische Modifikation

Eine der Strategien zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit von Proteinen und Peptiden ist die Erhöhung ihrer proteolytischen Stabilität. Diese Stabilitätserhöhung lässt sich erreichen, indem Peptide N- oder C-terminal modifiziert werden, um sie vor dem Abbau durch Exopeptidasen zu schützen. Übliche Verfahren sind die N-terminale Acetylierung oder C-terminale Amidierung (**Abb. 1 A**) [4]. Beide Methoden führten in früheren Studien bei einem Derivat, das von dem instabilen immunogenen Peptid MART-I27-35 abgeleitet wurde, zu einer signifikant erhöhten Plasmastabilität [10]. Als weiteres Beispiel lässt sich das GRF-Analogon (GRF = Growth Hormone Releasing Factor) Tesamorelin anführen, das zur Vermeidung der HIV-assoziierten Lipohypertrophie (Fettansammlungen) eingesetzt wird und das N-terminal an einem Tyrosinrest mit einer ungesättigten 3-Hexenoylgruppe modifiziert wurde. Dadurch kommt es im Vergleich zum natürlichen Wachstumshormon GRF – HWZ sechs Minuten – zu einer wesentlich verlängerten Halbwertszeit von einer Stunde für das Tesamorelin [11]. Weitere Möglichkeiten zur Stabilisierung von Peptiden ist der gezielte Austausch oder die Modifizierung sensibler Aminosäurereste an bekannten Spaltstellen. Beispiele hierfür sind der hormonell wirksame Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonist Buserelin, der zur Therapie von hormonabhängigen Tumoren verabreicht wird, [12] sowie das Wachstumshormon Ipamorelin [13, 14].

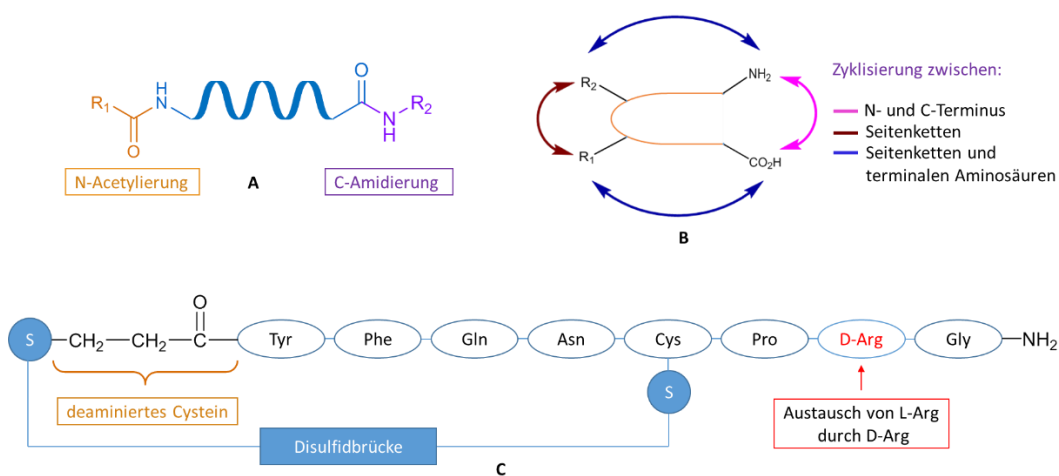


Abbildung 1. Strategien zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit von Proteinen. **(A)** N-terminale Acetylierung oder C-terminale Amidierung; **(B)** Zyklisierung; **(C)** Austausch von L-Aminosäuren durch D-Analoga und Zyklisierung im Desmopressin.

Der Austausch natürlicher Aminosäuren durch D-Analoga oder durch andere ungewöhnliche Aminosäuren erschwert in der Regel die Erkennung der Peptide durch proteolytische Enzyme und erhöht dadurch deren Stabilität. Um den Abbau durch Exopeptidasen zu unterbinden, werden in vielen Fällen vor allem die N- und C-terminalen Aminosäuren durch D-konfigurierte Analoga ausgetauscht [15]. Beispiele hierfür sind das Antidiuretikum Desmopressin und das synthetische Somatostatin-Analogon Octreotid, welches zur Behandlung von Magen-Darm-Tumoren zugelassen ist. Desmopressin enthält ein D-Arginin im C-terminalen Bereich. Im Vergleich zum L-Arginin-Derivat (HWZ ca. 10-35 min) besitzt Desmopressin eine deutlich verlängerte Plasmahalbwertszeit von etwa 37 Stunden [15, 16] (*Abb. 1 C*). Allerdings gibt es auch Ausnahmen, bei denen analoge Modifizierungen keinen Vorteil mit sich brachten. Ein Beispiel hierfür ist ein Dermorphinderivat, bei dem der Einbau einer D-Aminosäure im Vergleich zum Ausgangspeptid sogar zu einem rascheren Abbau geführt hat [16].

Eine weitere Strategie zur Verlängerung der Wirkdauer von Peptiden ist deren Zyklisierung. Dadurch wird die jeweilige konformelle Flexibilität reduziert, wodurch in der Regel auch die Stabilität der Peptide verbessert wird. Für die Zyklisierung existieren zahlreiche Möglichkeiten (*Abb. 1 B*). Die Verknüpfung kann beispielsweise zwischen N- und C-Terminus, zwischen Seitenketten untereinander oder auch zwischen Seitenketten und terminalen Aminosäuren erfolgen. Eine interessante Entwicklung sind Rückgrat-zyklisierte Verbindungen, bei denen die Amidstickstoffe der Peptidbindung mit funktionalisierten Alkylgruppen substituiert werden und dadurch eine Zyklisierung gestatten; hierdurch bleiben die Seitenketten der Peptide erhalten. Häufig werden solche Zyklisierungen mittels Lactamisierung, Lactonisierung, Disulfidbrücken, Ringschlussmetathese oder mittels Cyloadditionsreaktion erreicht [17-19].

1.2.2 Fusion der Peptide mit Plasmaproteinen oder Polymeren

Plasmaproteine wie Albumin- und Immunoglobulin-Fragmente (IgG-Fragmente) besitzen eine sehr lange natürliche HWZ von etwa 19-21 Tagen im Menschen [20]. Aufgrund ihrer hohen Molekulargewichte (67-150 kDa) werden sie im Glomerulum zurückgehalten und nicht renal filtriert. Außerdem binden diese Moleküle in Endosomen bei einem relativ niedrigen pH-Wert an den neonatalen Fcγ-Rezeptor (FcRn). Danach kommt es zum Recycling und bei einem höheren extrazellulären pH-Wert wieder zur Freisetzung des Proteins.

Dadurch entgehen diese Plasmaproteine dem lysosomalen Verdau. Daher kann die kovalente Bindung von Peptiden an Albumin oder an IgG-Fragmente die renale Eliminierung reduzieren, was zu einer verlängerten Plasmahalbwertszeit der Peptide führt [21-24]. Das Ankoppeln des Peptids an das Albumin wird entweder durch chemische Konjugation oder durch rekombinante Expression des Peptid-Albumin-Fusionsproteins ermöglicht. Für die chemische Verknüpfung des Peptids an das Albumin wird vorzugsweise die freie Thiol-Gruppe des Cys34 auf der Albuminoberfläche genutzt [25]. Als Beispiel ist das Albumin-Exendin-4-Konjugat (CJC-1134-PC) zu nennen, das eine HWZ von acht Tagen besitzt und das derzeit in der klinischen Entwicklungsphase II zur Behandlung von Typ-2-Diabetes untersucht wird [26]. Hierbei ist Exendin-4 über einen an Lysin gekoppelten Maleinimid-Linker an Cystein34 des Albumins gebunden [27]. Andere peptische Wirkstoffe, die mit derselben Strategie an Albumin gekoppelt wurden, sind der C34-Peptid HIV-Fusionsinhibitor sowie Insulinderivate [25]. Zu den Peptid-Albumin-Konjugaten, die mittels genetischer Fusion erzeugt wurden, zählt Albiglutid, ein dimeres Analogon des antidiabetisch wirksamen Inkretins GLP-1. Das Fusionspeptid hat im Vergleich zum isolierten GLP-1 (HWZ drei Minuten) eine wesentlich längere HWZ von 6-8 Tagen. Seit dem Jahr 2014 ist Albiglutid in der Europäischen Union (EU) und in der Schweiz als Injektionspräparat zugelassen (Eperzan®) [27, 28]. Die Bindung des Peptids an Albumin kann *in vivo* auch durch relativ hydrophoben albuminbindenden Molekülen erfolgen, die zuvor kovalent an die Peptidwirkstoffe gekoppelt werden. Einige dieser kleinen Moleküle sind in der nachfolgenden **Abb. 2** zu sehen.

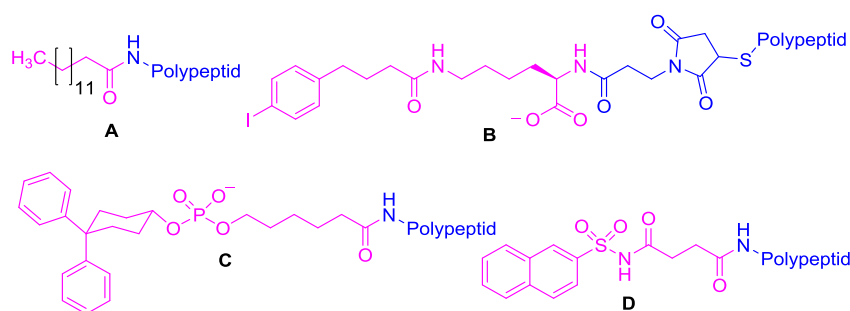


Abbildung 2. Strukturen albuminbindender Moleküle, die an Peptide ankoppelbar sind [21]. (A) Myristinsäure [29]; (B) 6-(4-(4-Iodophenyl)butanamido)hexanoat („Albu“-tag) [30, 31]; (C) Diphenylcyclohexanol-phosphatester [32]; (D) Naphthalinacylsulfonamid [33].

Die ersten Studien zur Halbwertszeitverlängerung mittels albuminbindender Moleküle wurden am Insulin durchgeführt. Hierzu wurden gesättigte Fettsäuren, welche das Serum-

albumin mit schwacher Affinität (K_D -Werte von 10-100 μM) binden, an die C-terminale Lysin-Seitenkette (LysB29) eines um eine Aminosäure verkürzten Insulin-Analogons geknüpft [29]. Das erste Konjugat dieses Typs mit einem Myristinsäurerest ist das Insulin detemir (LEVEMIR[®], Novo Nordisk), das im Jahr 2004 zur Behandlung von Diabetes mellitus zugelassen wurde. Ein weiteres Peptid, das mit Palmitinsäure acetyliert wurde, ist das GLP-1-Analogon Liraglutid, eine Inkretin-Mimetikum, das im Jahr 2009 die Zulassung für die Behandlung von Typ-2-Diabetes-Patienten erhielt. Im Rahmen der Modifizierung wurde die Aminosäure Lys34 des GLP-1 durch Arg ersetzt, und an Lys26 wurde über einen Glu-Spacer ein C₁₆-Fettsäurederivat angehängt. Hierdurch konnte die HWZ von zwei Minuten für GLP-1 auf dreizehn Stunden verlängert werden [34]. Aufgrund schlechterer Löslichkeit ist die Acylierung mit langkettigen Fettsäuren jedoch nicht für alle Peptidwirkstoffe anwendbar [33].

Die Reduzierung der renalen Filtration und der damit verbundenen Erhöhung der HWZ lässt sich auch durch die Konjugation der Peptide mit Polymeren wie Polyethylenglykol (PEG) erreichen. Überdies verlangsamt die Konjugation den Abbau der Peptide durch Proteasen (**Abb. 3**).

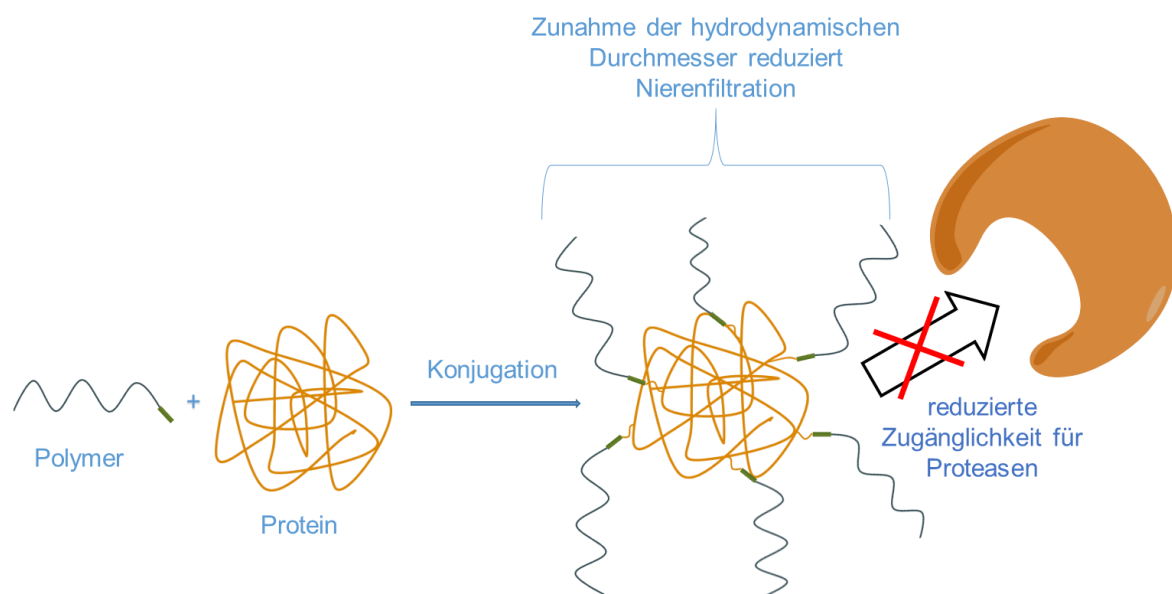


Abbildung 3. Konjugation von Proteinen oder Peptiden mit Polymeren.

Die kovalente Verknüpfung von PEG an Proteine (PEGylierung) wurde erstmals im Jahr 1977 von Abuchowski et al. beschrieben [35]. Durch Studien mit PEG in Lösung wurde

nachgewiesen, dass jede PEG-Monomereinheit zwei bis drei Wassermoleküle zu binden vermag [36]. Demzufolge kann durch chemische Konjugation eines Wirkstoffs mit dem wasserlöslichen und physiologisch weitgehend inerten PEG dessen hydrodynamischer Radius vergrößert werden, sodass die rasche Eliminierung über die Niere reduziert wird. Zusätzlich bildet das PEG eine hydrophile Hülle um das Protein, die das Protein gegenüber dem Immunsystem und den Proteasen abschirmt [21]. Jedoch erfolgt die Kopplung aktivierter PEG-Derivate an N-terminale α -Aminogruppen oder an ϵ -Aminogruppen in den Seitenketten von Lysinresten zufällig. Eine weitere Möglichkeit ist, die Kopplung der Polymere an Cysteinreste [36, 37]. Zusätzliche Kopplungsmethoden für PEG-Ketten sind in einem Übersichtsartikel zusammengefasst [38].

Die PEGylierung ist eine etablierte Strategie zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit von Proteinen und Peptiden. Inzwischen sind zahlreiche pegylierte Wirkstoffe zugelassen [39-42]. Die Herstellung der pegylierten Proteine in der für therapeutische Anwendungen erforderlichen Reinheit ist jedoch aufwendig und kostspielig. Außerdem bereitet die Produktheterogenität Probleme. PEG ist nicht biologisch abbaubar. Infolgedessen kann es bei langfristiger Anwendung zu einer Anreicherung der entsprechenden Derivate in der Leber kommen. Dies führt zu einem makromolekularen Syndrom [43-46], hierbei handelt es sich um Ablagerungen von makromolekularen Substanzen, die zu einer Verstopfung der Gefäße führen können. Auch die Vakuolenbildung in der Niere ist als Nebenwirkung bekannt [47, 48]. Die chemische PEGylierung kann auch zu einer Verminderung der Wirksamkeit führen, beispielsweise besitzt pegyliertes Interferon alfa-2a (PEGASYS®) nur noch 7 % der antiviralen Aktivität des unmodifizierten Interferons.

Die Verwendung von Polymeren aus bestimmten Kombinationen der kleinen ungeladenen Aminosäuren Prolin, Alanin, Serin (PAS-Sequenzen) zeigte einen dem PEG vergleichbaren Effekt, jedoch werden hier die mit PEG assoziierten Nachteile vermieden [49, 50]. Die PAS-Sequenzen lassen sich mit mehreren hundert Resten (200-600) in Fusion mit therapeutisch relevanten Proteinen problemlos rekombinant in löslicher und aktiver Form in *E. coli* herstellen. Dadurch entfällt die aufwendige nachfolgende Modifizierung mit Polymeren [51]. Außerdem entstehen homogene Fusionsproteine. Aufgrund der biologischen Zusammensetzung der PAS-Sequenzen sind toxische Effekte nicht zu erwarten. Weiterhin erwiesen sich diese Polymere in Studien als sehr resistent gegen den Abbau durch Serumproteasen. Zudem wurde keine immunogene Wirkung nachgewiesen. Eine Inkubation mit

einem Enzymextrakt aus Nierengewebe zeigte, dass diese Polymere rasch abgebaut werden. Folglich ist bei diesen biologischen Sequenzen eine Organakkumulation wie bei PEG weitgehend ausgeschlossen [49].

Bei der sog. HESylierung wird der Peptidwirkstoff mit Poly(Hydroxyethylstärke)chitin oder Poly(Carboxymethylstärke)chitin modifiziert, um auf diese Weise ähnliche Effekte wie bei der PEGylierung zu erzielen. Allerdings hat sich die HESylierung als verträglicher erwiesen, da sich die Polymere besser biologisch abbauen lassen [52]. Auch Liposomen werden vielfach in der Medizin eingesetzt, um die Bioverfügbarkeit peptidischer Therapeutika zu verbessern [53].

2 Liposomen

Liposomen sind geschlossene zwiebelschalenartig aufgebaute, sphärische Vesikel aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten, die ein diskretes wässriges inneres Kompartiment einschließen [54]. Sie sind biokompatibel und vermögen sowohl hydrophile als auch hydrophobe Wirkstoffe von ihrer Umgebung abzuschirmen. Der eingeschlossene Wirkstoff wird vor enzymatischem Abbau geschützt und nach und nach aus den Liposomen freigesetzt. Damit fungieren die Liposomen als eine Art Wirkstoffreservoir. Der Einschluss in den Liposomen reduziert auch eine mögliche Opsonisierung größerer Wirkstoffmoleküle und die damit verbundene Phagozytose, wodurch die Immunogenität sowie andere Nebenwirkungen der Wirkstoffe vermieden werden. Zusätzlich können diese Lipidformulierungen an ihrer Oberfläche mit spezifischen Targetliganden versehen werden, die den Wirkstoff zum gewünschten Wirkort, zum Beispiel zum erkrankten Gewebe, transportieren (**Abschnitt 2.4**). Durch diese zielgerichteten Therapieansätze sollen Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe minimiert werden. Inzwischen wurden verschiedene Typen von Liposomen entwickelt, die sich in ihrer Größe, Zusammensetzung, Oberflächenladung und Struktur unterscheiden.

Die Liposomen wurden in den 1960er Jahren entdeckt, als Bangham und Mitarbeiter das Verhalten von Phospholipiden (PL) erforschten. Dabei wurde unter dem Mikroskop beobachtet, wie sich aus amphiphilen Phospholipiden in wässrigem Medium spontan konzentrische, vielschichtige Lamellen ausbildeten. Jede dieser Lamellen war von der anderen durch ein wässriges Kompartiment getrennt [54-56]. Kurze Zeit später führten Sessa und Weissmann [57] für diese Lipidvesikel den Begriff „Liposomen“ ein. **Abb. 4** gibt einen Überblick unterschiedlicher Strukturen, die Phospholipide in wässrigen Lösungen annehmen können.

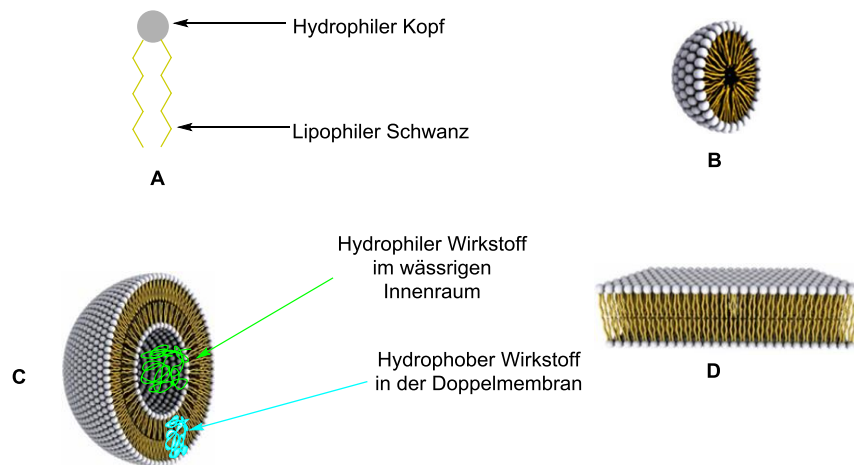


Abbildung 4. Schematische Darstellung von Phospholipiden und deren räumliche Anordnung in Vesikeln. (A) Phospholipide; (B) Mizellen; (C) Liposomen; (D) Doppellipidschicht. Im Gegensatz zu Liposomen, die aus einer oder mehreren Doppellipidschichten bestehen, sind Mizellen nur aus einer Lipidschicht aufgebaut. Hierbei richten sich die PL-Moleküle so aus, dass die hydrophoben Ketten nach innen zeigen und kaum Kontakt zum polaren Lösungsmittel aufweisen. Der polare Anteil ist dem Wasser zugewandt und befindet sich an der Mizellenoberfläche. Bei den Liposomen sind die hydrophilen Teile der PL-Moleküle zur wässrigen Phase innerhalb und außerhalb des Liposoms ausgerichtet. Die Abb. wurde in Anlehnung an Bitounis D. erstellt [58].

Phospholipide sind amphotere Moleküle, die eine hydrophile Kopfgruppe und einen lipophilen Teil aus Fettsäureresten aufweisen (Abb. 5).

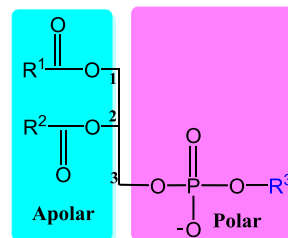
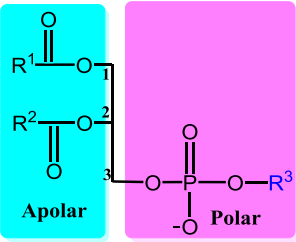
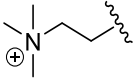
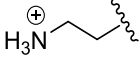
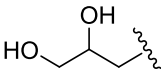
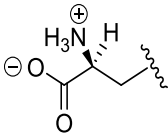


Abbildung 5. Schematischer Aufbau eines Phospholipids, R^1 und R^2 sind Alkylgruppen der Fettsäuren.

Als Grundgerüst dient ein Glycerolmolekül mit seinen drei Hydroxylgruppen. Die Hydroxylgruppe am C3, die über eine Phosphodiesterbindung mit einem weiteren Molekül R^3 verknüpft ist, bildet die hydrophile Kopfgruppe. Als R^3 können neben Cholin auch andere kleine Moleküle wie Ethanolamin, Glycerol, Inositol oder Serin vorhanden sein. Die restlichen Hydroxylgruppen an den Positionen 1 und 2 sind mit Fettsäuren (R^1 und R^2) verestert und ergeben den lipophilen Teil. R^1 und R^2 können 12 bis 24 Kohlenstoffatome aufweisen. Auch Doppelbindungen innerhalb der Kohlenstoffkette sind möglich. Die Anzahl der Doppelbindungen und die Länge der Fettsäurereste haben einen entscheidenden

Einfluss auf die Eigenschaften der Phospholipide. So nimmt die Phasenumwandlungstemperatur der Phospholipide (T_m), welche die Durchlässigkeit der Phospholipidmembranen maßgeblich beeinflusst [59], mit wachsender Kohlenstoffkette des Fettsäurerests zu, nimmt jedoch mit der Anzahl vorhandener Doppelbindungen ab. In **Tabelle 1** sind verschiedene Phospholipide zusammengefasst, die zur Herstellung von Liposomen verwendet werden.

Tabelle 1. Struktur und Eigenschaften synthetischer Phospholipide mit membranbildenden Eigenschaften [60].

					
Bezeichnung	Struktur der Kopfgruppe R^3	Lipophile Fettsäurereste R^1 und R^2	Kürzel	T_m (°C)	Ladung pH 7,4
Phosphatidyl-Cholin (PC)		$2 \times C_{16}$ (Palmitinsäure)	DPPC	41	0
		$2 \times C_{18}$ (Stearinsäure)	DSPC	55	0
		$2 \times C_{18:1}$ (Ölsäure)	DOPC	-22	0
Phosphatidyl-Ethanolamin (PE)		$2 \times C_{14}$ (Myristinsäure)	DMPE	50	0
		$2 \times C_{16}$ (Palmitinsäure)	DPPE	63	0
		$2 \times C_{18:1}$ (Ölsäure)	DOPE	-16	0
Phosphatidyl-Glycerol (PG)		$2 \times C_{14}$ (Myristinsäure)	DMPG	23	-1
		$2 \times C_{16}$ (Palmitinsäure)	DPPG	41	-1
		$2 \times C_{18:1}$ (Ölsäure)	DOPG	-18	-1
Phosphatidyl-Serin (PS)		$2 \times C_{14}$ (Myristinsäure)	DMPS	38	-1
		$2 \times C_{16}$ (Palmitinsäure)	DPPS	54	-1
		$2 \times C_{18:1}$ (Ölsäure)	DOPS	-11	-1

Für die Herstellung von Liposomen werden häufig neben den symmetrischen Phospholipiden auch unsymmetrische PL mit unterschiedlichen Acylketten R^1/R^2 eingesetzt. Hierzu zählen Lecithine, die aus natürlichen Quellen gewonnen werden und die sich durch einen

hohen Anteil ungesättigter Fettsäurereste auszeichnen. In der Regel werden jedoch die hydrierten Formen der nativen PL bevorzugt, da die Eliminierung der Doppelbindungen zu einer erhöhten Stabilität der Liposomen gegenüber oxidativen Abbauprozessen und zu einer geringeren Permeabilität führt [61]. Aufgrund der Heterogenität der natürlichen PL kommen in der Forschung bevorzugt definierte synthetische PL zum Einsatz.

2.1 Physikochemische Eigenschaften der Liposomen

Abhängig von der Temperatur kann die Phospholipidmembran in unterschiedlichen Phasen vorliegen, da sich die Anordnung der PL-Moleküle ändert. So geht die Lipiddoppelschicht ab einer charakteristischen Temperatur T_m , von einem geordneten festen Gelzustand in den flüssig-kristallinen Zustand über, in dem die einzelnen Lipidmoleküle relativ frei beweglich sind. Im geordneten Gelzustand sind dagegen die Fettsäureketten der Phospholipide in einem quasikristallinen Gitter fixiert [62]. Für den Phasenübergang ist eine trans-gauche Isomerisierung verantwortlich, die in der Alkylkette einen Knick verursacht und die reguläre periodische Struktur des Gelzustands zerstört (**Abb. 6**). Die daraus resultierende Reduzierung der Packungsdichte erhöht die Fluidität der Membran für den eingeschlossenen Wirkstoff und führt somit zu dessen Freisetzung [63]. Diese unerwünschte Wirkstofffreisetzung lässt sich durch Verwendung von Cholesterol einschränken, das bei der Herstellung der Liposomen zur PL-Mischung in einer bestimmten Konzentration zugesetzt wird. Das Cholesterolemolekül füllt Lücken in der Vesikelmembran und führt dadurch zu einer Verfestigung der Membranstrukturen mit reduzierter Fluidität [64, 65].

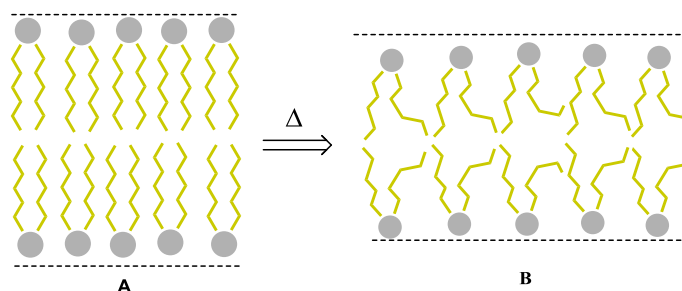


Abbildung 6. Schematische Darstellung der temperaturabhängigen Änderung der Packung der Acylketten in einer Phospholipidmembran. (A) Quasi-kristalliner Gelzustand und (B) flüssig-kristalliner Zustand.

Neben der Fluidität hat die Netto-Oberflächenladung, die ein PL in die Liposomenmembran einbringt, entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der Liposomen. Diese Ladung, die auch

als Zetapotential bezeichnet wird, beeinflusst die Interaktionen der Liposomen untereinander, aber auch deren Interaktionen mit Plasmaproteinen oder Zellen. Liposomen mit einem größeren negativen oder positiven Zetapotential stoßen sich gegenseitig ab, liegen daher bevorzugt monodispers vor und sind relativ stabil. Die gewünschte Ladung lässt sich durch die Verwendung von PL mit geladenen Kopfgruppen in Liposomen einbringen. Das Zetapotential hat auch maßgeblichen Einfluss auf den Einsatzzweck der Liposomen. So werden kationische Liposomen mit positivem Zetapotential bevorzugt in der Gentherapie zur Verkapselung negativ geladener DNA und RNA verwendet.

Sowohl die Partikelgröße der Liposomen als auch ihr Zetapotential lassen sich mit einem Zetasizer-Gerät erfassen. Bei der Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers wird das Dynamische-Lichtstreuungs-(DLS-)-Verfahren eingesetzt. Hierbei wird der bekannte Doppler-Effekt ausgenutzt, um die Bewegungen von Molekülen zu verfolgen. Dabei wird der Diffusionskoeffizient der Teilchen bestimmt, aus dem die Partikelgröße berechnet werden kann. Mit dieser Methode lassen sich außer den hydrodynamischen Radien auch Verteilungsbreiten (Polydispersitäten) und Aggregationseffekte ermitteln.

2.2 Wechselwirkungen der Liposomen mit Zellen

Die Wechselwirkungen der Liposomen mit Zellen hängen vom Zelltyp und von den Eigenschaften der Vesikel ab [66]. Die Zellen des Mononukleär-phagozytären Systems (MPS-Zellen) nehmen Liposomen hauptsächlich durch Phagozytose auf. Das MPS ist ein Teil des Immunsystems und repräsentiert die Gesamtheit aller phagozytoseaktiven, von Monozyten abstammenden Körperzellen. Diese dienen als Teil des Immunsystems der Abwehr und der Beseitigung von Abfall- und Fremdpartikeln sowie von Krankheitserregern. Mit den nicht-phagozytierenden Zellen können Liposomen über adsorptive Bindungen interagieren oder sogar mit ihnen fusionieren. Bei diesem Vorgang verschmilzt die Lipidmembran der Liposomen mit der Zytoplasmamembran der Zellen. Dabei wird der liposomale Inhalt in das Zytosol abgegeben. Zudem können die nicht-phagozytierenden Zellen Liposomen endozytotisch aufnehmen; ein PL-Austausch zwischen den Lipidvesikeln und den zellulären Membranen ist ebenfalls möglich. Meist findet man eine Kombination all dieser Interaktionen [66, 67].

2.3 Liposomen als Arzneimittelträger – der Weg von konventionellen Liposomen zu Stealth-Liposomen

Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit biologischen Membranen wurden Liposomen seit ihrer Entdeckung bei biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen als Membranmodelle eingesetzt. Ihre potentielle Eignung als Arzneimittelträger wurde erst im Jahr 1970 erkannt, als Sessa und Weissmann über den Einschluss von Lysozym in Liposomen berichteten [68]. Mittlerweile wurden die Liposomen zur Behandlung verschiedener Erkrankungen untersucht, wie zum Beispiel Krebs, Infektionserkrankungen (HIV oder Malaria), Hauterkrankungen, Lungen- und Lebererkrankungen [69].

Die konventionellen Liposomen weisen abhängig von ihren physikochemischen Eigenschaften wie (Netto-)Oberflächenladung, Größe und Fluidität eine Reihe von Problemen auf. Auch die Art der Plasmaproteine, die an ihnen binden, hängt von diesen Parametern ab [70-72]. Im Allgemeinen werden große Liposomen nach intravenöser Applikation innerhalb von wenigen Minuten recht schnell von dem Mononukleär-phagozytären System aus der Blutzirkulation entfernt. Daher erreichen sie kaum andere Zellen als die Makrophagen der Leber und Milz [73, 74]. Für die Erkennung von Liposomen durch das MPS ist die Bindung sogenannter Oponine (Antikörper + Komplementfaktoren) an deren Oberfläche erforderlich. Hierzu gehören Immunglobuline [75], Fibronektine [76], Beta-2-Glykoprotein [77] und C-reaktives Protein [78]. Die Instabilität der Liposomen in Plasma wird auch durch einen Transfer ihrer Phospholipidmoleküle zu *high* (HDL) und *low density*-Lipoproteinen (LDL) verursacht; dadurch kann es zu einer raschen Freisetzung des eingeschlossenen Wirkstoffs im Plasma kommen [74, 79, 80].

Die ersten Versuche, um die Liposomenstabilität zu verbessern, zielten auf die Abwandlung der Lipidmembrankomponenten ab. Damen et al. (1981) konnten zeigen, dass der Einbau von Cholesterol (CH) in die Lipidmembran deren Packungsdichte erhöht und somit den Transfer von Phospholipiden zu HDL reduziert [81]. Auch Vesikel aus Phosphatidylcholin (PC) mit gesättigten Acylketten besitzen eine verbesserte Plasmastabilität im Vergleich zu denen mit ungesättigten Fettsäureresten [82]. Jedoch kann lediglich der Einsatz von Cholesterol oder gesättigten Phospholipiden in der Liposomenformulierung das Problem der Plasmaproteinbindung und der damit verbundenen MPS-Aufnahme keinesfalls lösen. Aus diesem Grund wurde eine weitere Strategie entwickelt, die die Bindung von

Plasmaproteinen durch sterische Abschirmung der liposomalen Oberfläche verhindern soll. Diese Strategie führte von den sogenannten *first-generation liposomes*, die für MPS anfällig waren, zu den *second-generation liposomes*, den *stealth*-Liposomen, mit erheblich verbesserter Plasmastabilität. Bei den *stealth*-Liposomen handelt es sich um Lipidformulierungen, die mit hydrophilen Polymeren wie PEG modifiziert werden, um deren Stabilität *in vivo* zu verbessern [83-85]. PEG-Polymere bilden flexible Kettenstrukturen um die Liposomenoberfläche aus, die als „periliposomal layer“ bezeichnet wird. Dadurch werden die Bindung anderer Moleküle wie Opsonine aus dem Plasma und die anschließende Phagozytose verhindert [74]. Dies führt letztendlich zu einer längeren Verweildauer PEG-modifizierter Liposomen in der Blutzirkulation. Solche maskierten *Stealth*-Liposomen können entweder mit einem *Target-Ligand* ausgestattet werden, der sie an den gewünschten Wirkort befördert, oder sie können passiv in bestimmten Geweben oder Organen akkumulieren. Das Phänomen der passiven Anreicherung dieser PEG-enthaltenden Liposomen in Tumorgewebe wird als EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention*) bezeichnet [86]. Die Endothelzellen der Kapillargefäße von Tumoren weisen im Vergleich zu gesundem Gewebe eine erhöhte Fenestrierung und somit größere Öffnungen auf, durch die die Liposomen leichter in das Tumorgewebe eindiffundieren und sich dort anreichern können. Die Akkumulation ist auch durch ein mangelhaftes lymphatisches System in den Tumoren bedingt, wodurch es zu einem verminderten Abtransport eindiffundierter Partikel kommt [87-89]. Dieses Phänomen kann für die tumorgerichtete Therapie von Krebserkrankungen mit Zytostatika-beladenen Liposomen ausgenutzt werden [87, 90]. Erfolgreiche Beispiele sind die Liposomenformulierungen des Doxorubicins. Durch dessen Einbau in Liposomen ist es gelungen, die kardiotoxischen Nebenwirkungen des Wirkstoffs deutlich zu reduzieren. Inzwischen sind mehrere Liposomenpräparate mit Doxorubicin zugelassen (Myocet, Doxil, LipoDox und Thermodox) [91]. Darüber hinaus verhindert das Anbringen des PEG-Polymeres die Vesikelaggregation und verbessert damit die Lipidstabilität. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von PEG auf der Liposomenoberfläche eine sogenannte *interbilayer repulsion* bewirkt, wodurch Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Liposomen abgeschwächt werden und somit deren Aggregation verhindert wird [92]. Eine Untersuchung von Liposomen mit einem PEG1900-Lipid zeigte, dass der Polymerrest 50 Angström über die Oberfläche hinausragt [74, 92]. Dabei ist die Flexibilität des eingesetzten Polymeres von Bedeutung; das weniger flexible Dextran ist für den beschriebenen Zweck ungeeignet [93]. Jedoch können Liposomen auch mit anderen

flexiblen Polymeren wie Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Polyacrylamid (PAA) modifiziert werden [94, 95]. Auch das peptidähnliche Polymer Poly(2-methyl-2-oxazolin), kurz PMOXA, wurde für die Herstellung von Stealth-Liposomen eingesetzt [96]. Die Verwendung von L-Aminosäure-basierten Polymeren führte zu einer verlängerten Blutzirkulationsdauer und zu einer reduzierten Aufnahme durch das MPS, wie sie auch durch Einsatz von DSPE-PEG2000 erreicht werden konnten. Aufgrund der biologischen Abbaubarkeit ist der Einsatz von Aminosäure-basierten Polymeren zur Modifizierung von Liposomen besser geeignet als PEG. In der Praxis ist jedoch PEG bisher das meistgenutzte Polymer, welches für die Herstellung lang zirkulierender Liposomen genutzt wurde. Das Anbringen des Polymers an die liposomale Oberfläche kann nachträglich erfolgen, entweder durch physikalische Adsorption des PEGs an präformulierte Liposomen oder auch durch kovalente Kopplung an funktionelle Gruppen auf der Vesikeloberfläche. Eine andere Strategie ist die Verwendung von zuvor pegylierten Phospholipidderivaten (PEG-Lipid-Konjugate) zur Liposomenherstellung. Häufig wird ein Konjugat aus (Methyl-)Polyethylenglykol und Distearoylphosphatidylethanolamin (DSPE-mPEG) in Konzentrationen bis zu 5 Mol-% verwendet (**Abb. 7**).

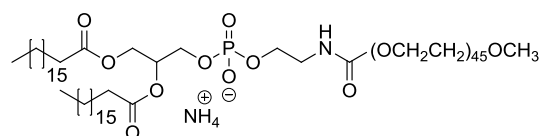


Abbildung 7. Chemische Struktur der DSPE-mPEG. Diese Verbindung wird durch chemische Konjugation von Distearoylphosphatidylethanolamin mit einem carboxylierten PEG-Monomethylether erzeugt.

2.4 Liposomen-Konjugate für spezifisches Targeting

Im Gegensatz zum passiven liposomalen *Targeting*, das die morphologischen Besonderheiten einiger solider Tumoren ausnutzt, werden zur zielgerichteten Adressierung geeignete Liganden an die Liposomen gebunden. Diese Liganden sind in der Lage, Zielzellen zu erkennen, an diese zu binden sowie die Aufnahme der Liposomen oder ihrer Inhalte zu induzieren. Als Liganden kommen monoklonale Antikörper (MAb) bzw. Antikörperfragmente, Glykoproteine, Kohlenhydrate, aber auch niedermolekulare Substanzen wie etwa Folsäure, zum Einsatz [97, 98]. Diese Liganden werden entweder kovalent oder nicht-kovalent an präformulierte Liposomen gebunden. Bei lang zirkulierenden PEG-Liposomen wird der Adressierungsligand direkt an den Lipidbilayer (**Abb. 8 A**) oder an das Ende der PEG-Ketten angeknüpft (**Abb. 8 B**) [99].

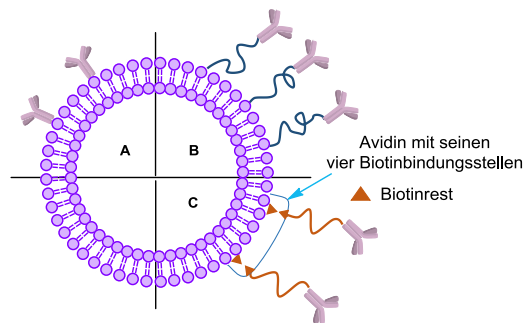


Abbildung 8. Konjugation von Liganden an PEG-Liposomen. (A) Kovalente Kopplung an eine Phospholipid-Kopfgruppe, (B) Kopplung an den PEG-Terminus und (C) Avidin-Biotin-Methode.

Die nichtkovalente Konjugationsmethode basiert auf adsorptiver Bindung oder auf Interaktionen zwischen Avidin mit Biotin (**Abb. 8 C**) [100-102]. Bei der letztgenannten Strategie wird die hohe Affinität von Biotin zum Avidin ausgenutzt; denn Avidin besitzt mehrere Bindungsstellen für Biotin mit einer Assoziationskonstante von etwa 10^{14} bis 10^{15} M^{-1} . Bei dieser Methode werden zunächst Liposomen hergestellt, die einen Biotinrest auf der Oberfläche besitzen. Die Einführung des Biotinrestes erfolgt durch Verwendung eines biotinylierten Phospholipids als Membrankomponente. Nun wird Avidin hinzugegeben, das an Biotin bindet. Anschließend können biotinylierte Liganden an weitere Biotinbindungsstellen des Avidins gebunden werden. Allerdings können auch quervernetzte Aggregate aus biotinylierten Liposomen entstehen. Bei der kovalenten Kopplung werden beispielsweise eine Carboxylfunktion des Liganden mit Carbodiimidderivaten aktiviert, so dass sie mit

nukleophilen Gruppen, wie primären Aminogruppen im Phosphatidyl-Ethanolamin auf der Oberfläche der Liposomen, reagieren können [103]. Aufgrund fehlender Spezifität und schlechter Ausbeuten sowie einer gewissen Toxizität der Carbodiimidderivate wurden in der Folgezeit andere Kopplungsstrategien entwickelt. Dabei wurden modifizierte thiolaktive Phospholipidderivate wie Maleimidophenylbutyrat-PE (MPB-PE) [104, 105] oder N-Pyridyldithiopropionyl-PE (PDP-PE) [106] als Lipidkomponenten eingesetzt. Beide PL-Derivate reagieren im neutralen Milieu mit Thiolen unter Bildung eines Thioethers (**Abb. 9 A**) oder eines Disulfids (**Abb. 9 B**). Die Thioetherbindungen sind im Vergleich zur Disulfidbrücke stabiler [104].

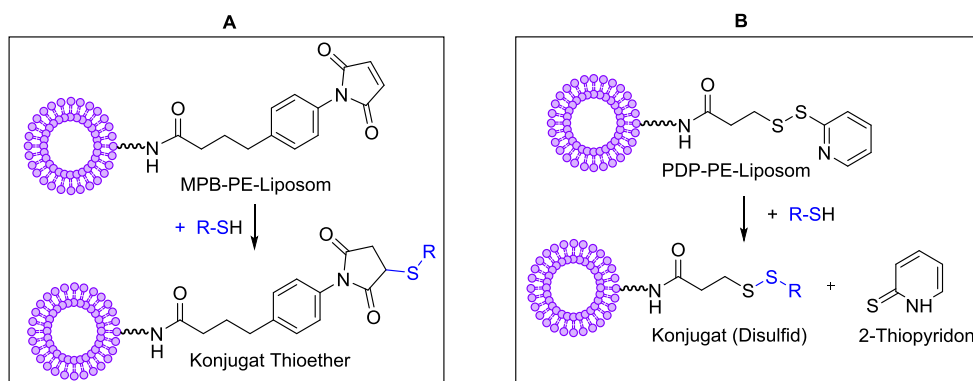


Abbildung 9. Spezifische kovalente Verknüpfung von Thiolen an geeignete Kopfgruppen der Phospholipide auf der Oberfläche von Liposomen. Thiolkupplung an MPB-PE-Liposomen (**A**) und an PDP-PE-Vesikel (**B**).

Die auf der Ligandenseite notwendigen Thiolgruppen können entweder aus freien Cysteinen stammen oder nachträglich chemisch eingeführt werden. Dazu werden Liganden mit 2-Iminothiolan (Trauts-Reagenz), SPDP (N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio-)propionat) oder SATA (N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat) umgesetzt. Der Einsatz von Trauts-Reagenz liefert in einem Schritt das sulfhydrylierte Produkt, welches allerdings aufgrund seiner Oxidationsempfindlichkeit nicht lagerfähig ist (**Abb. 10 A**). Dieser Nachteil wird durch die Modifizierung mit SATA (**Abb. 10 B**) vermieden [107]. Die Acetyl-Schutzgruppe ist zur Kopplung nicht erforderlich und wird vorher mit Hydroxylamin abgespalten.

Zur Herstellung lang zirkulierender PEG-Liposomen, die gleichzeitig den Targetliganden enthalten, werden modifizierte Phospholipide wie PDP-PEG-PE [108, 109] und die Maleimid-(MI-)-Derivate MI-PEG-PE [110, 111] sowie MI-PEG-Cholesterol [112] verwendet. Die Kopplung des Adressierungsliganden an die Kopfgruppen dieser modifizierten Phospholipide erfolgt analog zur oben beschriebenen Kopplung von Thiolen

an PDP-PE oder an MPB-PE (**Abb. 9**). Die Carbodiimid-Methode wurde zur Kopplung von Folsäure an Amino-PEG-PE angewandt [113]. Eine weitere Methode bezieht sich auf die Verwendung von Cyanur-PEG-PE [114]. Hierbei wird das Protein durch nukleophile Substitution ohne eine vorhergehende Derivatisierung an Liposomen gebunden.

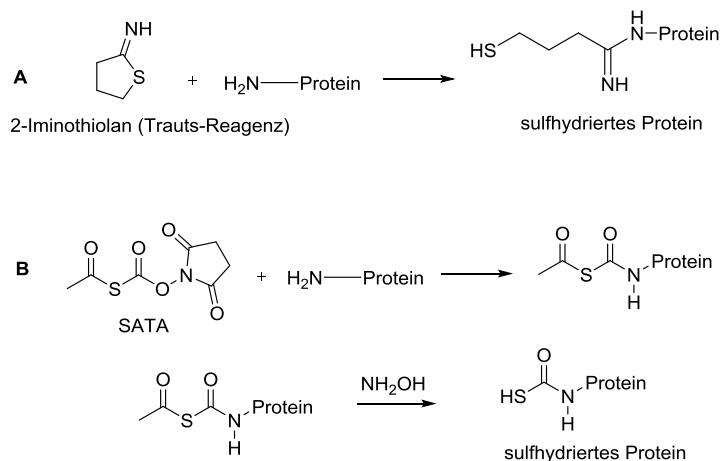


Abbildung 10. Sulfhydrierung von Proteinen. (A) mit 2-Iminothiolan (Trauts-Reagenz) und (B) mit SATA.

2.5 Herstellung der Liposomen mit der Filmmethode

Die Liposomen werden gemäß ihrer Partikelgröße in *small*, *large* und *giant* sowie aufgrund ihrer Lamellarität in unilamellar, oligolamellar und multilamellar eingeteilt. Unilamellare Vesikel weisen nur eine Lamelle auf, während oligolamellare Vesikel aus zwei bis drei Lamellen bestehen. Multilamellare Liposomen besitzen demzufolge mehr als drei Lamellen.

Aus der Literatur sind zahlreiche Methoden zur Herstellung der Liposomen bekannt. Im Folgenden wird die sogenannte „Filmmethode“ beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Dazu werden die in Pulverform vorliegenden Phospholipide in einem organischen Lösungsmittelgemisch, z.B. MeOH/DCM (1/1, v/v), gelöst. Anschließend wird das Lösungsmittel mit einem Rotationsverdampfer entfernt. Der am Kolbenboden zurückbleibende homogene und transparente Lipidfilm wird mit einer wässrigen Puffer-Lösung, welche die einzubauende Substanz in bestimmter Konzentration enthält, hydratisiert. Durch spontane Selbstassoziation entstehen multilamellare und unterschiedlich große Liposomen. Durch weitere Verfahrensschritte wie Extrusion, Hochdruckhomogenisation sowie Ultraschallung ist es möglich, kleinere Vesikeln mit definierter Membranzahl und Partikelgrößenverteilung zu erhalten.

3 Blutgerinnung

Die Blutungsstillung wird als Hämostase bezeichnet. Sie ist eine lebenswichtige Funktion, welche dem Organismus ermöglicht, Schäden in Gefäßen abzudichten und somit einen zu starken Blutverlust zu verhindern. An der Regulation und der Aufrechterhaltung der Hämostase sind plasmatische, zelluläre und vaskuläre Faktoren beteiligt. Die Hämostase verläuft in drei Schritten [115]:

1. Vasokonstriktion des verletzten Gefäßes
2. Thrombozytenadhäsion und -aggregation
3. Plasmatische Gerinnung

Die Blutungsstillung kann auch grob in zwei Phasen eingeteilt werden, der primären und der sekundären Hämostase. Bei der schnell einsetzenden primären Hämostase kommt es zu einer lokalen Vasokonstriktion im verletzten Gefäßareal sowie zu einer Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten (**Abb. 11**). Nach einer Gefäßverletzung freigesetzte, vasokonstriktorisch wirksame Substanzen wie Thromboxan A₂, Serotonin und PDGF lösen die Aktivierung der glatten Gefäßmuskulatur und vasomotorischer Nerven aus. Dies führt zu einer schnellen Verengung der beteiligten Gefäße und letztendlich zur Drosselung des Blutzufusses im Bereich der Läsion. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Adhäsion der Thrombozyten an freiliegende subendotheliale Kollagenfasern des verletzten Gefäßendothels. Diese Wechselwirkung erfolgt über Adhäsivproteine wie den Von-Willebrand-Faktor (vWF), der sowohl an subendotheliale Kollagenfasern als auch an seinen spezifischen Rezeptor – dem Glykoprotein Ib/IX – auf der Oberfläche der Thrombozyten binden kann. Die Adhäsion der Thrombozyten sorgt für einen ersten Wundverschluss und zu einer Aktivierung der Thrombozyten. Die aktivierten Thrombozyten setzen verschiedene Mediatoren wie Calcium-Ionen, ADP, Serotonin und Thromboxan A₂ frei. Hierdurch werden weitere Thrombozyten angelockt (Chemotaxis), die sich nach und nach an das wachsende Aggregat anlagern. Zudem werden durch die freigesetzten Mediatoren die Expression und der Transport des thrombozytären Fibrinogenrezeptors (GP IIb/IIIa) an die Thrombozytenoberfläche gesteigert. Mit Hilfe des Fibrinogenrezeptors (GP IIb/IIIa) erfolgen die Quervernetzung und die Aggregation der Thrombozyten über Plasmaproteine, wie etwa Fibrinogen [116-119]. Hierdurch kommt es zur Bildung eines noch instabilen Blutpfropfs (**Abb. 11**),

durch die trypsinartige Serinprotease Plasmin wieder abgebaut werden. Dieser Prozess wird als Fibrinolyse bezeichnet. Plasmin liegt im Plasma als inaktives Plasminogen vor, das in der Leber synthetisiert und intravaskular durch den Gewebeplasminogenaktivator (t-PA) aktiviert wird. Im Gegensatz dazu wird extrazelluläres Plasminogen bevorzugt durch Urokinase (uPA) aktiviert. Eine überschießende Fibrinolyse und eine damit verbundene Blutungsneigung kann durch direkte Plasminhemmung [123, 124] oder durch Inhibierung der Plasminogenaktivatoren erreicht werden. Der Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ I (PAI-1) hemmt sowohl t-PA als auch Urokinase. Plasmin selbst lässt sich durch den endogenen Inhibitor α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP) direkt inhibieren [125].

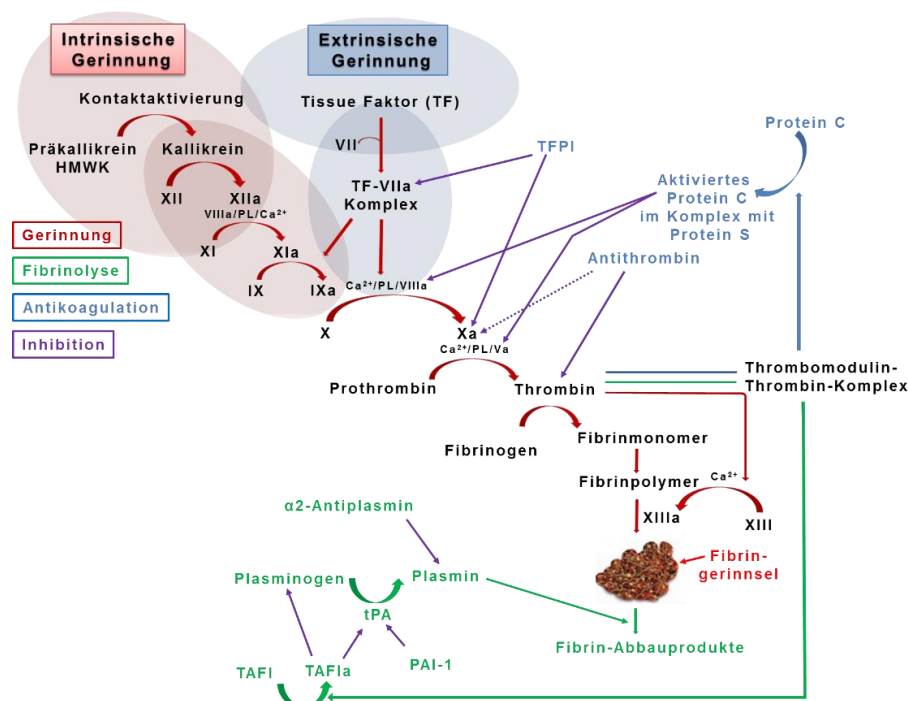


Abbildung 12. Schematische Darstellung des Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systems. Nach einer Gefäßverletzung freigelegtes Kollagen adsorbiert den Faktor XII (Hageman-Faktor), der anschließend durch Plasmakallikrein zu FXIIa aktiviert wird. FXIIa wandelt Faktor XI in FXIa um, der wiederum mit Hilfe seines Kofaktors FVIIIa den FX zu FXa aktiviert. Die extrinsische Gerinnungsaktivierung wird durch ein geschädigtes Endothel ausgelöst. Beim Eintreten des Bluts in das Gewebe kommt es in Gegenwart des freigesetzten Gewebsthromboplastins (FIII oder *tissue factor*) zur Aktivierung des Gerinnungsfaktors FVII zu FVIIa. FVIIa aktiviert zusammen mit Calcium-Ionen FX zu FXa. Im letzten gemeinsamen Schritt bewirkt der Prothrombinase-Komplex aus FXa, FVa und Ca^{2+} -Ionen auf Phospholipidoberflächen die Umwandlung von Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa). Das aktivierte Thrombin spaltet Fibrinogen in Fibrinmonomere, die sich zu Fibrinfibrillen zusammen lagern. Danach erfolgt die Quervernetzung dieser Monomere durch die Transglutaminase FXIIIa zu einem stabilen Fibrinpolymer. Die Abb.12 wurde vom Internet entnommen und modifiziert ^[III].

^[III] <http://practical-haemostasis.com/Screening%20Tests/pt.html>.

3.1 Struktur des Thrombins

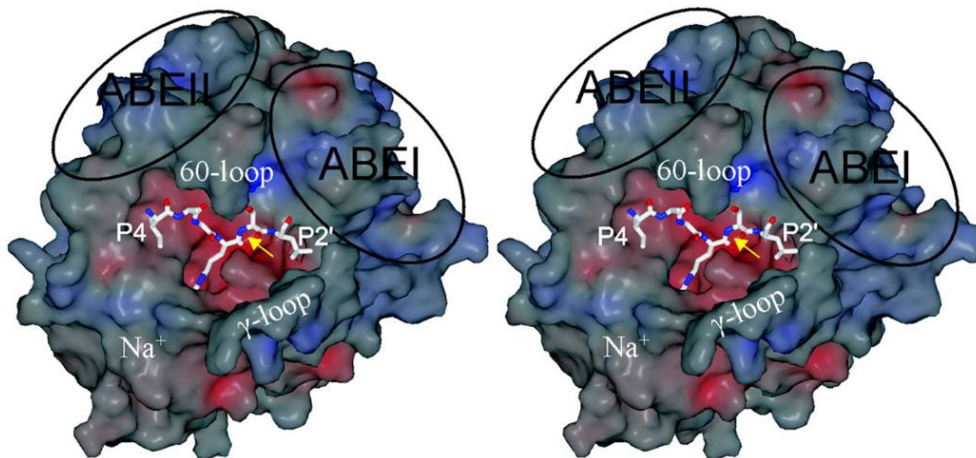


Abbildung 13. Stereodarstellung des Thrombins im Komplex mit dem Hexapeptidsubstrat IAGRSL (entspricht dem P4-P2'-Segment des Antithrombins). Die Oberfläche des Thrombins ist entsprechend des berechneten elektrostatischen Potentials eingefärbt (rot, negativ und blau, positiv). Der gelbe Pfeil weist auf die Peptidbindung zwischen den P1- und P1'-Resten. Das aktive Zentrum besitzt eine tiefe Bindetasche, die oben von dem sogenannten 60er-Insertionsloop und unten vom Gamma-Loop begrenzt wird. Daneben sind noch die beiden basischen Anionbindungsseiten (ABEI und ABEII) und die Na⁺-Bindungsregion dargestellt. Die Abbildung wurde aus der Literatur entnommen [126].

Thrombin ist eine tryptinartige Serinprotease und wird als Zymogen Prothrombin in der Leber gebildet. Das aktivierte Enzym mit einem Molekulargewicht von ca. 32 kDa besteht aus einer leichteren A-Kette und der eigentlichen Proteasedomäne, der B-Kette. Die A- und B-Ketten sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft; die Konformation der B-Kette wird durch drei weitere Disulfidbrücken zwischen sechs konservierten Cysteinen stabilisiert. Thrombin ist ein ellipsoides Molekül; sein aktives Zentrum wird durch zwei Schleifen (60er- und Gamma-Loop) begrenzt, die für die Ausbildung einer tiefen und engen Bindetasche verantwortlich sind (**Abb. 13**). Am Boden der S1-Tasche befindet sich die saure Seitenkette des Asp189. Dadurch spaltet Thrombin bevorzugt Substrate mit Arginin in P1-Position. Die katalytische Triade wird von den Resten Ser195, His57 und Asp102 gebildet. Der negativ geladene Oxyanion-Übergangszustand während der Substratspaltung wird durch die beiden Amidstickstoffe des Gly193 und Ser195 stabilisiert, die das sogenannte *oxyanion hole* bilden. Die S2-Tasche wird durch die Aminosäuren Tyr60A, Trp60D und His57 sowie durch die hydrophobe Seitenkette des Leu99 begrenzt. Die Reste Tyr60A-Pro60B-Pro60C-Trp60D sind Teil des 60er-Insertionsloops, der eine Art Deckel über der S2-Tasche ausbildet. Daher bevorzugt Thrombin in Substraten und in substratanalogen

Inhibitoren nur mittelgroße, hydrophobe Aminosäuren wie Valin oder Prolin. Links der S2-Tasche befindet sich die hydrophobe distale S3/S4-Tasche, die auch als Aromatenbindungsstelle (*ary-binding-site*) bezeichnet wird. Der Boden der S3-Tasche wird durch den Indolring des Trp215 gebildet, und die Tasche wird rechts durch die hydrophobe Seitenkette des Leu99 und links durch Ile174 begrenzt. Darüber hinaus besitzt Thrombin zwei stark positiv geladene Regionen, die Fibrinogen-Bindungsregion (*anion binding exosite I, ABE-I*) und die Heparin-Bindungsstelle (*anion binding exosite II, ABE-II*) [127]. Die ABE-I ist an der Bindung des Fibrinogens beteiligt. Die Heparin-Bindungsstelle interagiert über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem stark sauren Makromolekül Heparin. Thrombin besitzt auch eine Na⁺-Bindungsregion. Durch das Andocken von Natrium-Ionen entsteht aus der Na⁺-freien „slow“ Form die „fast“ Form. Durch diese Konformationsänderung vermag Thrombin prokoagulatorischen Substrate schneller zu spalten [128, 129].

3.2 Regulationen der Blutgerinnung

An hämostaseologischen Prozessen sind neben den Gerinnungsfaktoren und Blutplättchen auch Endothelzellen aktiv beteiligt, die das Lumen aller Blutgefäße auskleiden und sowohl antithrombotische als auch prothrombotische Eigenschaften besitzen. Ein gesundes Endothel stellt eine athrombogene Oberfläche dar, die weder das plasmatische Gerinnungssystem noch eine Adhäsion und Aggregation von Blutplättchen fördert. Darüber hinaus geben Endothelzellen eine Vielzahl von Substanzen ab, die den Gerinnungsprozess hemmen oder welche die endogene Fibrinolyse regulieren. Durch diese Kontrollmechanismen wird eine überschießende Aktivierung der Gerinnung und der Fibrinolyse verhindert, die zu Thrombosen oder Blutungen führen könnte. Die wichtigsten endogenen Inhibitoren im Gerinnungssystem sind Antithrombin (AT) und *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) sowie die Komponenten des Protein-C-Weges [130-133]. AT und TFPI sind sogenannte Serpine (Serinproteaseinhibitoren), die an das aktive Zentrum des jeweiligen Gerinnungsfaktors gebunden und dort gespalten werden. Danach kommt es zu einer starken Umfaltung des Protease-Inhibitor-Komplexes, und die Protease bleibt inaktiviert. Zur Hemmung des fibrinolytischen Systems dienen die endogenen Inhibitoren α_2 -Antiplasmin (α_2 AP) und PAI-1 [134].

3.3 Proteaseinhibitoren als Therapeutika

Das Gerinnungssystem lässt sich durch die Hemmung der Thrombozytenaggregation und der am Gerinnungssystem beteiligten Enzyme pharmakologisch beeinflussen. Diese Substanzen werden als Antithrombotika bezeichnet, die entsprechend ihrer primären Angriffspunkte in zwei Klassen unterteilt werden, die Thrombozytenaggregationshemmer und die Antikoagulantien. Thrombozytenaggregationshemmer unterdrücken die Aggregation der Thrombozyten in der primären Hämostase, während die Antikoagulantien die Fibrinbildung in der sekundären Hämostase verhindern [135]. Je nach Wirkmechanismus werden die Antikoagulantien in zwei weitere Gruppen unterteilt. Im Gegensatz zu den direkten Antikoagulantien, die unmittelbar die Gerinnungsfaktoren hemmen, beeinflussen die indirekten Antikoagulantien, wie etwa die Vitamin K-Antagonisten, die Ausbildung der korrekten Zymogenformen der Gerinnungsfaktoren. Hingegen verstärken die Heparine die Hemmwirkung des endogenen Inhibitors Antithrombin (AT). Die direkten Antikoagulantien lassen sich außerdem noch in Thrombin- oder in FXa-Inhibitoren unterteilen [136]. Je nach Applikationsroute unterscheidet man überdies zwischen oralen und parenteralen Wirkstoffen.

3.3.1 Indirekte Antikoagulantien

Heparin und seine Derivate sowie die oralen Vitamin-K-Antagonisten (4-Hydroxycumarine) zählen zu den indirekten Antikoagulantien. Das polyanionische Glucosaminglykan Heparin wirkt, indem es die Bindung des Antithrombins an die aktivierten Gerinnungsfaktoren IXa, Xa, XIa, XIIa und IIa sehr stark beschleunigt, wodurch es zu einer effizienteren Inaktivierung dieser Gerinnungsfaktoren kommt. Die vorwiegenden Nebenwirkungen der Heparine sind Blutungen und die lebensbedrohliche Heparin-induzierte Thrombozytopenie vom Typ II (HIT-II) sowie die weniger gefährliche HIT-I. Zu den sogenannten Thrombozytopenien kommt es, da Heparine aufgrund ihrer stark negativen Ladung mit bestimmten aus Blutplättchen freigesetzten Proteinen, wie beispielsweise mit dem Plättchenfaktor-4, spezifische Komplexe ausbilden. Gegen diese Komplexe (Antigene) werden im Körper Antikörper entwickelt. Nach Bindung an den jeweiligen Komplex docken die Antikörper mit ihrem Fc-Teil an einen Rezeptor auf den Thrombozyten an. Infolgedessen kommt es zum Verklumpen der Thrombozyten und zu einem deutlichen Abfall der Plättchenzahl, wodurch sowohl starke

Blutungen als auch lebensgefährliche Thrombosen auftreten können [137, 138]. Als Antidot des Heparins kann das stark basische Protein Protamin intravenös verabreicht werden, welches mit Heparin stabile Komplexe ohne gerinnungshemmende Wirkung ausbildet [139]. Cumarinderivate wie Phenprocoumon (Marcumar®) und Warfarin (Coumadin®) hemmen die Vitamin-K-abhängige γ -Carboxylierung der Zymogenformen der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X sowie der antikoagulatorischen Proteine C und S in der Leber [136]. Dadurch sind die Zymogene nicht mehr aktivierbar, und die Blutgerinnung wird gehemmt.

3.3.2 Parenterale Thrombininhibitoren

Thrombin ist das zentrale Enzym am Ende der Blutgerinnungskaskade. Die ersten Versuche zur Hemmung der Blutgerinnungskaskade über eine spezifische Thrombinhemmung erfolgten mit dem natürlichen Thrombinhemmstoff Hirudin in den 1950er Jahren [140]. Hirudin ist ein Polypeptid aus 65 Aminosäuren (Molekulargewicht ca. 7000 Da) und wurde ursprünglich aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* isoliert. Inzwischen sind zwei in *E.coli* rekombinant hergestellte Hirudinvarianten für die parenterale Applikation zugelassen. Jedoch hat Hirudin eine sehr enge therapeutische Breite. Aufgrund von möglichen Blutungskomplikationen wird es nur noch relativ selten, vor allem bei Patienten mit einer heparin-induzierten Thrombozytopenie vom Typ II, eingesetzt [141, 142]. Vom Hirudin wurde ein synthetisches Derivat abgeleitet, das als Hirulog-1 oder Bivalirudin bezeichnet wird [143]. Wie das natürliche Hirudin, so hemmt auch Hirulog-1 das Thrombin hochspezifisch mittels eines bivalenten Bindungsmodus, indem es gleichzeitig das aktive Zentrum und die ABE-I blockiert [144].

Die gerinnungshemmende Wirkung des natürlichen Hirudins ($K_i = 22$ fM) diene als Ausgangspunkt für die Suche nach synthetischen niedermolekularen Thrombininhibitoren mit potentieller oraler Bioverfügbarkeit. Ausgehend von bekannten Thrombinsubstraten, vor allem vom D-Phe-Pro-Arg-Typ, wurden erste synthetische Derivate erhalten. Dazu gehören der irreversible Inhibitor PPACK, der Arginal-Hemmstoff Efegatran oder das decarboxylierte Noragmatin-Derivat Inogatran (**Abb.14**) [145, 146]. Als erster kleinmolekularer synthetischer Thrombinhemmstoff wurde das sulfonylierte Arginin-Derivat Argatroban ($K_i = 17$ nM) in Japan im Jahr 1992 erstmals zugelassen. Neben diesen Arginin-Derivaten wurden auch zahlreiche Benzamidin-Verbindungen als hochwirksame Thrombinhemmstoffe identifiziert [147]. Zu dieser Gruppe gehört NAPAP ($K_i = 2,1$ nM) mit einem zentralen

D-4-Amidinophenylalaninrest, TAPAP mit einem zentralen 3-Amidinophenylalaninrest oder auch Melagatran, das einen C-terminalen 4-Amidinobenzylamidrest als Argininmimetikum besitzt. Aufgrund der starken Basizität der P1-Gruppe wurde für alle diese Inhibitoren nur eine marginale orale Bioverfügbarkeit bestimmt. Daher wurden in der Folgezeit zahlreiche Prodrugs und auch Thrombininhibitoren ohne basischen P1-Rest entwickelt, deren Strukturen in zahlreichen Übersichtsarbeiten zusammengefasst sind [148-150].

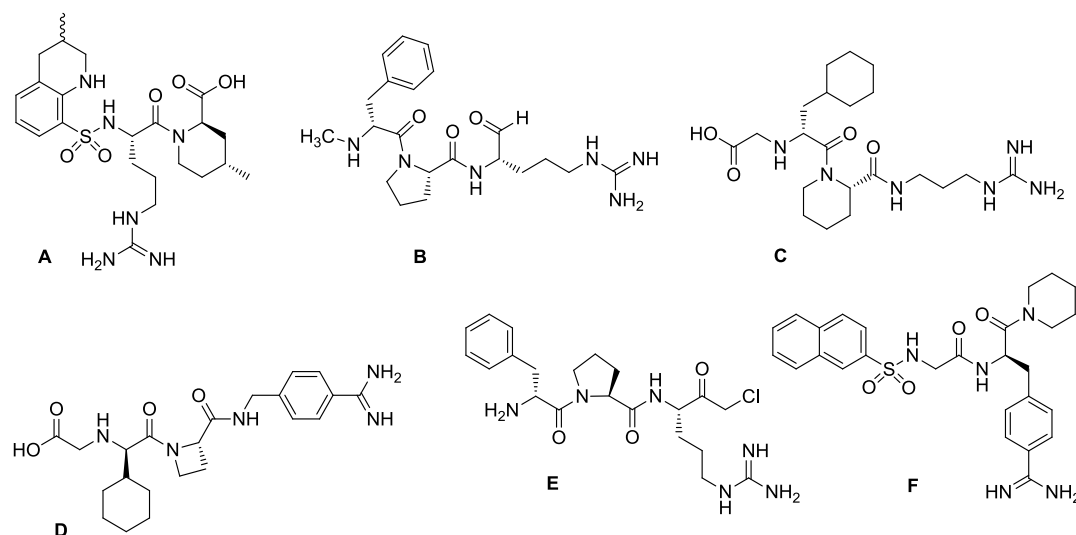


Abbildung 14. Strukturen einiger synthetischer Thrombininhibitoren. (A) Argatroban; (B) Efegatran; (C) Inogatran; (D) Melagatran; (E) PPACK; (F) NAPAP.

Vom Melagatran ($K_i = 2$ nM) wurde auch der Inhibitortyp abgeleitet, der als Ausgangspunkt für die in dieser Dissertation synthetisierten Inhibitoren diente. Im Gegensatz zum Melagatran besitzen diese Inhibitoren jedoch eine L-konfigurierte Aminosäure in P3-Position (Inhibitoren des Typs 1) oder eine Sulfonylgruppe als P4-Rest in Kombination mit einem D-konfigurierten P3-Rest (Inhibitoren des Typs 2). Bei den Inhibitoren des Typs 1 ist die Seitenkette der L-konfigurierten P3-Aminosäure ins Lösungsmittel gerichtet, bei den Inhibitoren des Typs 2 ist die N-terminale P4-Sulfonylgruppe modifizierbar. Wie bei Melagatran wurde eine 4-Amidinobenzylamidgruppe in P1-Position eingebaut, jedoch wurde der P2-Azetidincarbonsäurerest durch das günstigere Prolin ersetzt (**Abb. 15**).

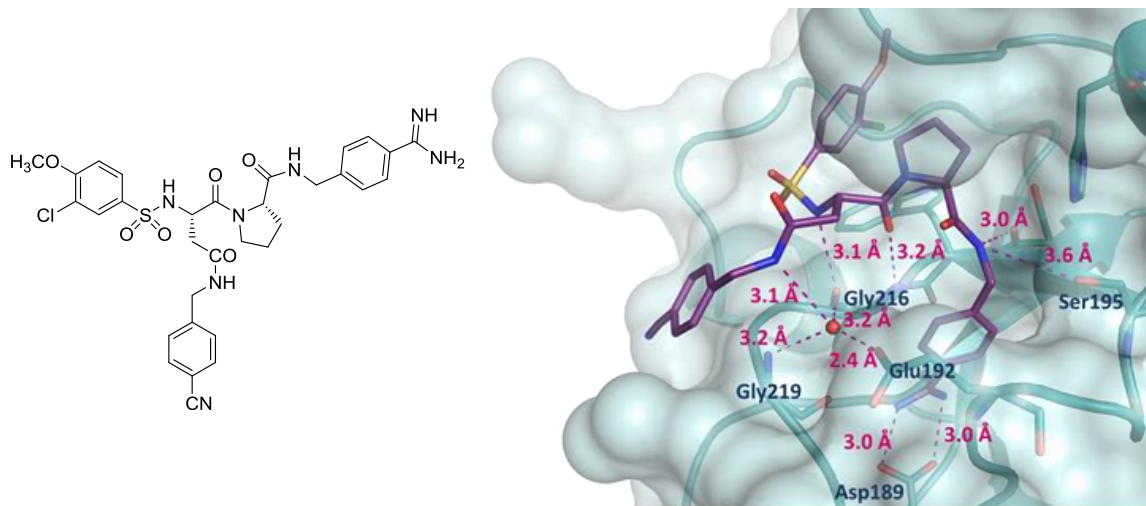


Abbildung 15. Kristallstruktur des Inhibitors 3-Cl-4-MeO-bs-Asn(4-CN-Bzl)-Pro-4-Amba im Komplex mit humanem Thrombin (rechts); links ist die Inhibitorstruktur dargestellt. Die Abbildung wurde aus der Literatur übernommen [151].

3.3.3 Direkte orale Antikoagulantien (DOAK)

Im Jahr 2003 wurde Ximelagatran [152] als erster oral applizierbarer Thrombinhemmstoff in Frankreich zugelassen (2004 in Deutschland), der aber kurze Zeit später infolge weniger Fälle von Hepatotoxizität wieder vom Markt genommen wurde. Seit einigen Jahren sind mehrere neue direkte orale Antikoagulantien (DOAK) auf dem Markt. Hierzu zählen der Thrombinhemmer Dabigatranetexilat (Pradaxa®), ein doppeltes Prodrug des Dabigatrans, sowie die Faktor-Xa-Hemmer Rivaroxaban (Xarelto®), Apixaban (Eliquis®) und Edoxaban (Lixiana®) [153]. Die wichtigsten Vorteile der DOAK sind die festen Dosierungsschemata und der Wegfall regelmäßiger Kontrollen des Gerinnungsstatus. Als Antidot für Dabigatran wurde vor kurzem ein hochspezifischer Antikörper zugelassen [154]. Für die oralen FXa-Hemmstoffe wird derzeit ein inaktiviertes FXa-Analogon in Phase III geprüft, bei dem das Ser195 durch Ala ausgetauscht ist [155]. Jedoch gab es auch bei der Verwendung von neuen oralen Antikoagulantien einige Fälle von Blutungskomplikationen [156].

4 Zielsetzung der Arbeit

Ein Nachteil vieler peptidischer oder peptidomimetischer Wirkstoffe ist deren proteolytische Instabilität und rasche Eliminierung aus der Zirkulation. So wurde bei vielen niedermolekularen benzamidinartigen Hemmstoffen von trypsinartigen Serinproteasen eine schnelle renale und/oder auch hepatobiliäre Eliminierung festgestellt [157-160]. Die renale Ausscheidung lässt sich prinzipiell durch deutliche Vergrößerung des hydrodynamischen Radius der Wirkstoffe über die Porengröße der Nierenglomeruli reduzieren. Eine starke bililäre Ausscheidung beobachtet man häufig für sehr hydrophobe Wirkstoffe, die zuvor von der Leber aufgenommen wurden [161]. Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, am Beispiel von Thrombininhibitoren als Modellsystem eine neue Strategie zur Molekulargewichtsvergrößerung von Proteasehemmstoffen zu etablieren, die auf einem Einbau der Wirkstoffe in die äußere Liposomenmembran basiert. Hierzu sollten die vom Benzamidin abgeleiteten substratanalogen Thrombininhibitoren vom Typ I und II (**Abb. 16**) über einen kleinen Ethylenglykol-Linker mit einem Palmitoylrest modifiziert werden, um sie in die äußere Liposomenmembran einbauen zu können. Durch diese Oligomerisierung sollte eine enorme Vergrößerung des hydrodynamischen Radius der Wirkstoffe erzielt werden, um deren schnelle renale Eliminierung zu verhindern.

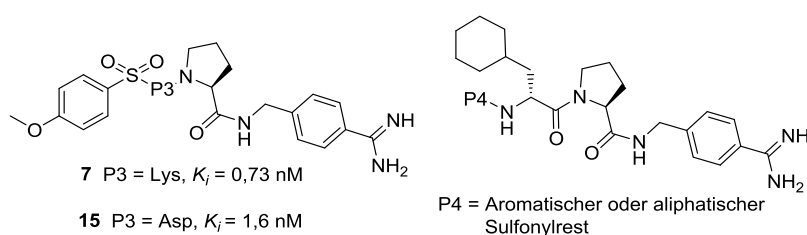


Abbildung 16. Thrombininhibitoren des Typs 4-MeO-Bs-L-Lys/Asp-Pro-4-Amba (Typ I) und vom Typ P4-D-Cha-Pro-4-Amba (Typ II).

Während der Inhibitortyp I sehr selektiv nur Thrombin im niedrig nanomolaren Bereich hemmt, ist der Typ II weniger spezifisch und inhibiert teilweise auch andere verwandte Proteasen wie FXa, Plasmin und uPA, obwohl die Wirkung auf diese Proteasen deutlich reduziert ist [151, 162]. Es sollte geprüft werden, ob es durch den zweiten Inhibitortyp mit D-konfigurierter und sulfonierter P3-Aminosäure zu einer noch stärkeren Gerinnungshemmung kommt. Aus Kristallstrukturuntersuchungen mit dem Inhibitortyp I im Komplex mit Thrombin war bekannt, dass die Seitenkette der L-Aminosäure in P3-Position ins

Lösungsmittel gerichtet ist und von der Bindetasche des Thrombins weg zeigt [151]. Daher war zu erwarten, dass eine Modifizierung an der P3-Seitenkette toleriert wird und die Hemmwirkung der Inhibitoren weitestgehend erhalten bleibt. Aufgrund vieler Kristallstrukturen des Inhibitortyps II mit Thrombin sollte auch in diesem Fall zu erwarten sein, dass eine N-terminale Modifizierung toleriert wird.

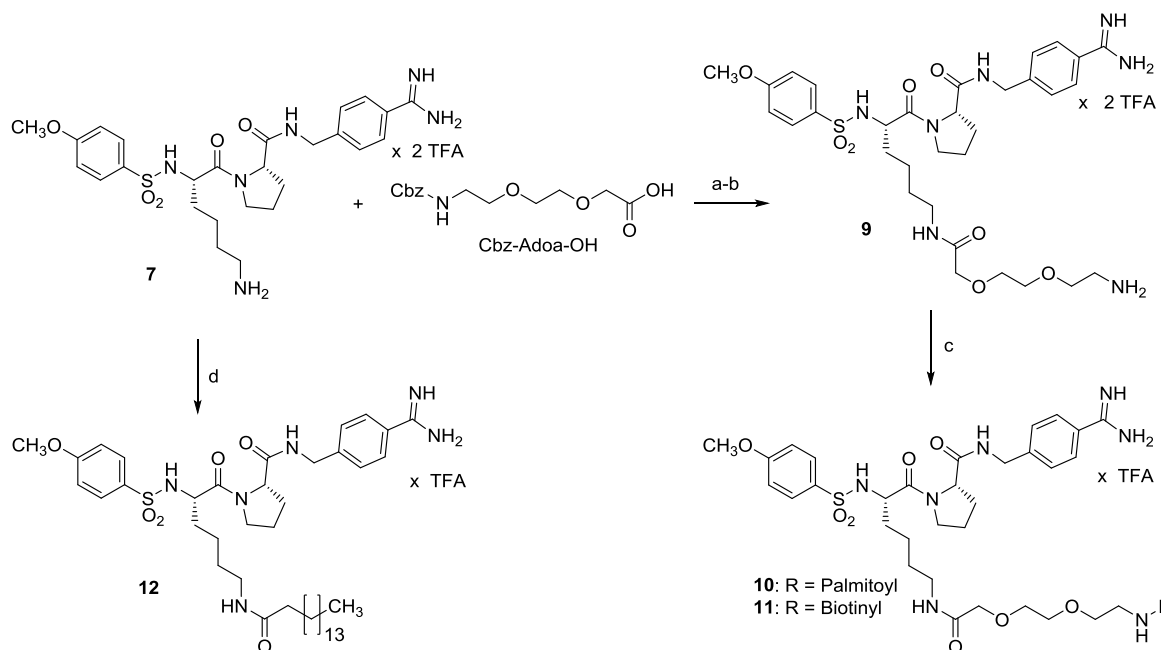
In Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Udo Bakowsky sollten die palmitoylierten Inhibitoren in Liposomen eingebaut werden. Alle Ausgangsverbindungen, deren palmitoylierte Derivate und die hergestellten Liposomen sollten enzymkinetisch auf ihre Hemmwirkung gegen Thrombin und auf weitere trypsinartige Serinproteasen untersucht werden. Zusätzlich sollte die antikoagulative Wirksamkeit ausgewählter Derivate in einem Gerinnungstest im Plasma geprüft werden. Parallel dazu sollte untersucht werden, ob sich die Verbindungen mit einer terminalen Aminogruppe zur gerinnungshemmenden Modifizierung von Oberflächen eignen. Für diesen Zweck sollte ein ausgewählter Inhibitor mit freier Aminogruppe an einen entsprechenden Glaträger kovalent gebunden und anschließend die gerinnungshemmende Wirkung dieses Trägers geprüft werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Synthesen

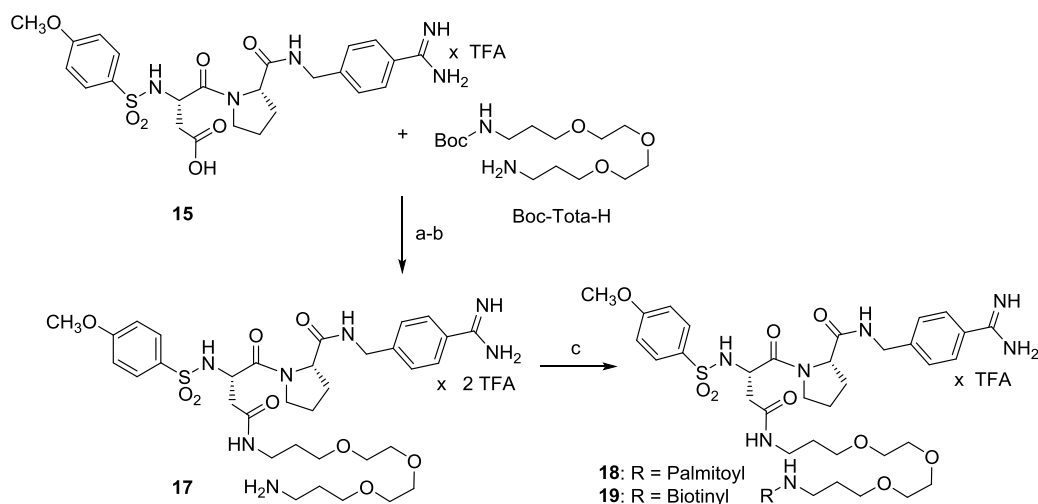
5.1.1 Synthese der Inhibitoren mit L-Aminosäuren in P3-Position (Typ I)

Zu Beginn der Arbeit wurden die Ausgangsinhibitoren mit Lys (**7**) und Asp (**15**) wie in der Literatur beschrieben [163] synthetisiert und gemäß *Schema 1* und *2* modifiziert. Hierfür wurde initial an den Lys-Inhibitor **7** die Aminosäure 8-(Cbz-amino)-3,6-dioxa-octansäure (Cbz-Adoa-OH) gekoppelt. Anschließende Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe ergab Inhibitor **9**, der entweder mit Palmitinsäure oder Biotin zu den Verbindungen **10** oder **11** umgesetzt wurde. Durch direkte Umsetzung von Inhibitor **7** mit Palmitinsäure wurde Verbindung **12** ohne Ethylenglykol-Spacer synthetisiert.



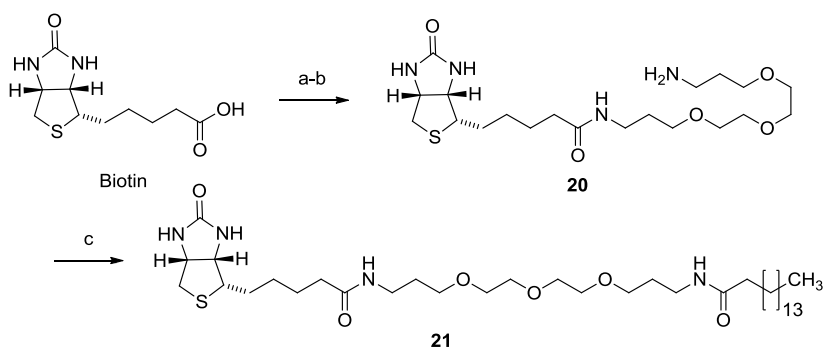
Schema 1. Synthese der Inhibitoren vom Typ-I mit L-Lys in P3-Position (**7** und **9-12**). (a) BOP, 2 Äquiv. DIPEA in DMF; (b) 32 % HBr in AcOH, präparative HPLC; (c) Palmitinsäure oder Biotin, BOP, 2 Äquiv. DIPEA in DMF, präparative HPLC; (d) Palmitinsäure, BOP, 2 Äquiv. DIPEA in DMF, präparative HPLC.

Auf analoge Weise wurde das Asp-Derivat **15** mit 1-(Boc-amino)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamin (Boc-Tota-H) gekoppelt (**Schema 2**). Die Abspaltung der Boc-Schutz-gruppe ergab Inhibitor **17**, welcher entweder mit Palmitinsäure oder Biotin zu Verbindung **18** bzw. **19** umgesetzt wurde.



Schema 2. Synthese der Inhibitoren vom Typ-I mit Asp/Asn in P3-Position (**15** und **17-19**). (a) BOP, 2 Äquiv. DIPEA in DMF; (b) TFA, präparative HPLC; (c) Palmitinsäure oder Biotin, BOP, 2 Äquiv. DIPEA in DMF, präparative HPLC.

Für die Präparation der bifunktionalisierten Liposomen wurde das biotinylierte Derivat **21** hergestellt. Hierzu wurde Boc-Tota-H im ersten Schritt mit Biotin gekoppelt. Das nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erhaltene Intermediat **20** wurde anschließend mit Palmitinsäure zu Verbindung **21** umgesetzt (**Schema 3**).

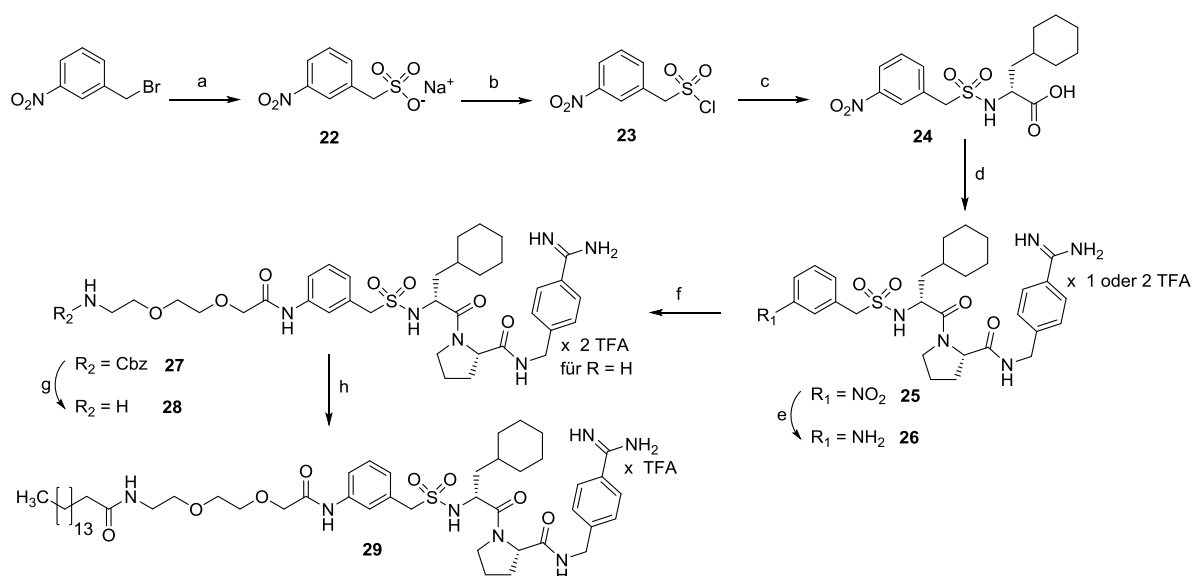


Schema 3. Synthese des palmitoylierten Biotinderivats **21**. (a) Boc-Tota-H, BOP, 2 Äquiv. DIPEA in DMF; (b) TFA, präparative Säulenchromatographie; (c) Palmitinsäure, BOP, 2 Äquiv. DIPEA in DMF, präparative Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (Laufmittel: Chloroform/Methanol/25 % NH_4OH , 80/20/1, v/v/v).

5.1.2 Substratanaloge Inhibitoren mit D-Cha in P3-Position

5.1.2.1 Inhibitoren mit D-Cha in P3-Position und aromatischen Sulfonylresten

Inhibitor **26** (3-NH₂-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba) wurde gemäß *Schema 4* hergestellt. Als Ausgangsverbindung diente 3-Nitrobenzylbromid, das mit Natriumsulfit in die Sulfonsäure umgesetzt wurde [164]. Deren Natriumsalz wurde mit Phosphorylchlorid angefeuchtet, mit Phosphorpentachlorid versetzt und bei 80 °C in das entsprechende Sulfonylchlorid überführt [164]. Aufgrund der reduzierten Stabilität der mit elektronenziehenden Gruppen substituierten Benzylsulfonylchloride im basisch-wässrigen Milieu erfolgte die Kopplung an D-Cha in DCM, wobei die Aminosäure zuvor durch Umsetzung mit Trimethylsilylchlorid in Lösung gebracht wurde [165]. Das erhaltene 3-NO₂-Bzls-D-Cha-OH (**24**) wurde anschließend mit Pro-4-Amba × 2 HCl in Verbindung **25** überführt, danach dessen Nitro-Gruppe zum Amin reduziert und der Inhibitor 3-NH₂-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba (**26**) erhalten. Der Inhibitor **26** wurde mit Cbz-Adoa-OH gekoppelt, die Cbz-Schutzgruppe abgespalten und das erhaltene Intermediat **28** wurde anschließend mit Palmitinsäure zur Verbindung **29** umgesetzt. Die Synthese und Modifizierung von 4-NH₂-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba (**34**) erfolgte auf analoge Weise ausgehend von 4-Nitrobenzylbromid und wird hier nicht gesondert aufgeführt.

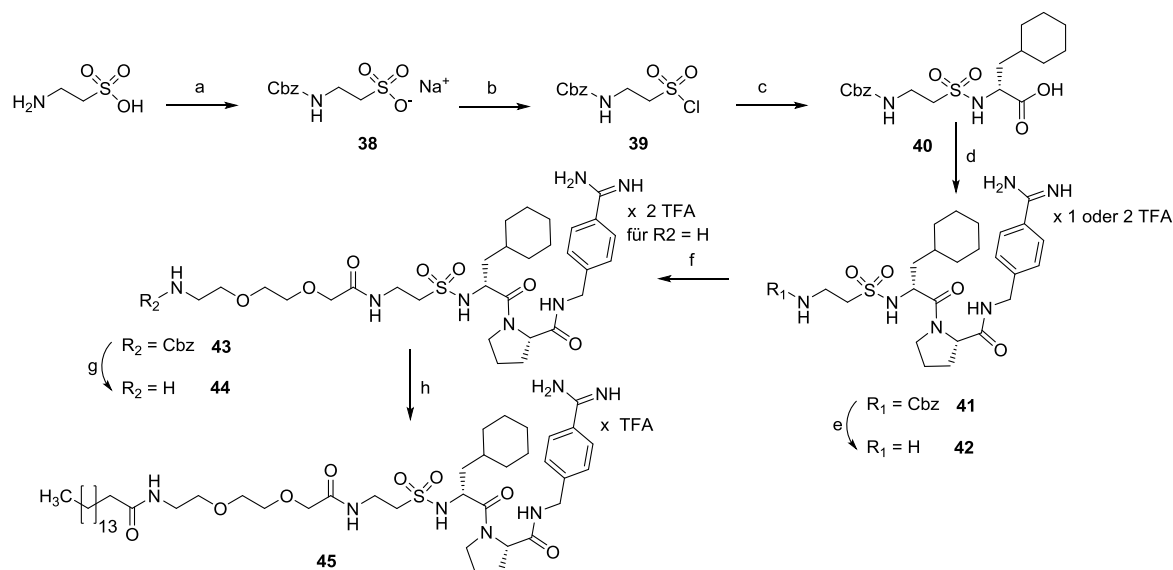


Schema 4. Synthese der Inhibitoren **25-26** und **28-29** mit D-Cha in P3-Position und aromatischen Sulfonylresten. (a) 1,1 Äquiv. Na₂SO₃, 5 h Reflux in H₂O; (b) POCl₃/PCl₅, 4 h bei 80 °C; (c) D-Cha, 2,3 Äquiv. TMSCl, 2,3 Äquiv. DIPEA, 1 h Reflux in DCM, danach 1,2 Äquiv. DIPEA in DCM, präparative Säulen-chromatographie; (d) H-Pro-4-Amba × 2 HCl, BOP, 2 Äquiv. DIPEA in DMF, präparative HPLC; (e) Pd/C in AcOH, H₂-Atmosphäre, präparative HPLC; (f) Cbz-Adoa-OH, BOP, 2 Äquiv. DIPEA in DMF; (g) 32 % HBr in AcOH, präparative HPLC; (h) Palmitinsäure, BOP, 2 Äquiv. DIPEA in DMF, präparative HPLC.

5.1.2.2 Inhibitoren mit D-Cha in P3-Position und aliphatischen Sulfonylresten

Die Synthese dieses Inhibitortyps ist in *Schema 5* dargestellt. Die Einführung der Cbz-Schutzgruppe an 2-Aminoethansulfonsäure (Taurin) erfolgte durch Umsetzung mit Cbz-Cl unter Schotten-Baumann-Bedingungen [166]. Die Chlorierung des Cbz-geschützten Sulfonats (**38**) wurde intial in Analogie zur Synthese der Benzylsulfonylchloride mit Phosphorpentachlorid unter Erhitzen (4 Stunden, 80 °C) und in Gegenwart von Phosphoroxychlorid (POCl₃) versucht. Jedoch konnte kein Produkt isoliert werden, da es zur Bildung nicht identifizierter Nebenprodukte kam. Offenbar ist für diese Reaktion ein geeignetes Lösungsmittel erforderlich. Alternativ beschreiben Dries und Mitarbeiter die Synthese von Taurinchloriden ausgehend von Fmoc- oder Boc-geschützten Aminosulfonaten mittels Triphosgen in Anwesenheit einer katalytischen Menge DMF und des Phasentransferkatalysators Tetra-*n*-butylammoniumbromid [167]. Jedoch konnte das erhaltene Intermediat **38** wie in der Literatur beschrieben mit POCl₃ in Sulfolan/CH₃CN (40 Minuten, 70 °C) chloriert werden [168]. Das Sulfonsäurechlorid (**39**) wurde anschließend ohne weitere Charakterisierung an D-Cha in DCM gekoppelt, das zuvor wieder in das Bis-Trimethylsilyl-

Derivat überführt wurde. Das Intermediat **40** (*Schema 5*) wurde im nächsten Schritt mit H-4-Pro-Amba $\times 2$ HCl umgesetzt und der geschützte Inhibitor **41** erhalten. Die Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe ergab den Hemmstoff **42**, der über seine freie Aminogruppe mit Cbz-Adoa-OH gekoppelt wurde. Nach Abspaltung der Schutzgruppe und anschließender Umsetzung mit Palmitinsäure wurde der Inhibitor **45** erhalten.



Schema 5. Synthese der Inhibitoren **41-42** und **44-45** mit D-Cha in P3-Position und aliphatischen Sulfonylresten. (a) 1,2 Äquiv. Cbz-Cl, 1 N NaOH, 30 Minuten bei 0 °C dann 2 h bei RT; (b) 1,9 Äquiv. POCl₃, in Sulfolan/CH₃CN, 40 Minuten bei 70 °C; (c) D-Cha, 2,3 Äquiv. TMSCl, 2,3 Äquiv. DIPEA, 1 h Reflux in DCM, danach 1,2 Äquiv. DIPEA in DCM, präparative HPLC; (d) H-Pro-4-Amba $\times 2$ HCl, BOP, 2 Äquiv. DIPEA in DMF, präparative HPLC; (e) 32 % HBr in AcOH, präparative HPLC; (f) Cbz-Adoa-OH, BOP, 2 Äquiv. DIPEA in DMF; (g) 32 % HBr in AcOH, präparative HPLC; (h) Palmitinsäure, BOP, 2 Äquiv. DIPEA in DMF, präparative HPLC.

5.2 Enzymkinetische Studien

5.2.1 Inhibitoren mit Lys und Asp/Asn in P3-Position

Die ermittelten Hemmkonstanten der Typ-I-Inhibitoren mit L-konfigurierten Aminosäuren in P3-Position gegenüber Thrombin und anderen trypsinartigen Serinproteasen sind in den **Tabellen 2** und **3** zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Verbindungen sehr selektive Thrombininhibitoren sind, welche die anderen untersuchten Proteasen nur marginal mit K_i -Werten $> 3 \mu\text{M}$ hemmen. Wie erwartet, wurde die Verlängerung der P3-Seitenkette mit einem Ethylenglykol-Derivat in beiden Inhibitorserien sehr gut toleriert. Im Falle der P3-Lys-Derivate blieb die Hemmwirkung nahezu erhalten, während im Falle der P3-Asn-Verbindungen **17-19** im Vergleich zum Ausgangsderivat mit Asp sogar verbesserte K_i -Werte im subnanomolaren Bereich ermittelt wurden. Eine ähnliche Tendenz wurde bereits in früheren Arbeiten mit diesem Inhibitor typ beobachtet [163]. In der Kristallstruktur eines P3-Asn-Inhibitors im Komplex mit Thrombin (3utu.pdb) war zu erkennen, dass zwischen dem Amid-Stickstoff der Asn-Seitenkette über ein verbrückendes Wassermolekül polare Wechselwirkungen zu den Thrombinresten Glu192, Gly216 und Gly219 ausgebildet werden (**Abb. 15**). Möglicherweise erklärt dies die stärkere Hemmwirkung der P3-Asn-Verbindungen im Vergleich zum Asp-Inhibitor.

Ein leicht reduzierter K_i -Wert wurde für den Inhibitor **12** ermittelt, bei dem der Palmitoylrest ohne Spacer direkt an die Lys-Seitenkette gekoppelt ist. Dieses Phänomen, das die direkte Acylierung von Inhibitoren mit längererkettigen Fettsäureresten zu einer reduzierten Hemmwirkung führen kann, wurde bereits in früheren Arbeiten mit einer Serie von Furin-inhibitoren beobachtet [169]. Hierbei wurde der N-terminale Phenylacetylrest des Inhibitors Phac-Arg-Val-Arg-4-Amba durch Acylketten unterschiedlicher Länge ausgetauscht, um die Zellpermeabilität der stark polaren Verbindungen zu verbessern. Bis zu einer Kettenlänge von etwa 10-12 C-Atomen blieb die Hemmwirkung nahezu unverändert; bei weiterer Verlängerung der Acylreste (C14 bis C18) kam es jedoch zu einem schrittweise immer stärkeren drastischen Abfall der inhibitorischen Wirkung. Es wurde vermutet, dass die Hemmstoffe mit längeren Acylketten Micellen ausbilden, wodurch die Hemmwirkung vermindert wird. Jedoch war auch eine unspezifische Bindung solcher Inhibitoren an die Oberfläche des Furins oder an die Wände von Reaktionsgefäßen denkbar. Eine Bindung

dieser mit Acylketten modifizierten Verbindungen an Serumalbumin (HSA/BSA) ist ebenfalls möglich. Dieses Plasmaprotein war im Falle der Furinmessungen standardmäßig im Messpuffer enthalten, um die Protease zu stabilisieren. Durch solche unspezifischen Wechselwirkungen könnte es zu einer Reduktion der freien Inhibitorkonzentration und demzufolge zu einer Abschwächung der Hemmwirkung kommen. Interaktionen dieser Art zwischen HSA und Fettsäureresten sind in der Literatur vielfach beschrieben und werden auch gezielt zur Halbwertszeitverlängerung genutzt [170, 171]. HSA ist das meistverbreitete Protein im Blut ($\sim 40 \text{ g/l}$) [172] und ist am Transport von Fettsäuren beteiligt. Es besitzt fünf Bindungsstellen für Fettsäuren mit mittlerer oder langer Alkylkette. Die Wechselwirkungen der Fettsäuren mit den jeweiligen Bindungsstellen sind unterschiedlich stark, im Falle der Myristinsäure wurden Dissoziationskonstanten zwischen $0,05 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ gefunden [173, 174]. Palmitate werden mit Konstanten zwischen $0,02 \mu\text{M}$ und $0,06 \mu\text{M}$ noch stärker gebunden [175].

Tabelle 2. Hemmwirkung der Inhibitoren mit Lys in P3-Position.

Nr.	R	K_i				aPTT
		Thrombin (nM)	FXa (μM)	Plasmin (μM)	uPA (μM)	IC ₂₀₀ ^[a] (μM)
7	H	0,73	$3,92 \pm 0,21$	$3,74 \pm 0,31$	$25,31 \pm 4,28$	0,10
9	Adoa-	$0,82 \pm 0,07$	$7,28 \pm 0,93$	$3,12 \pm 0,69$	$30,32 \pm 5,37$	0,12
10	Palmitoyl-Adoa-	$1,39 \pm 0,06$	$5,93 \pm 0,49$	$4,16 \pm 0,48$	$44,49 \pm 3,18$	0,32
11	Biotinyl-Adoa-	$0,89 \pm 0,04$	$3,52 \pm 0,49$	$3,59 \pm 0,57$	$31,36 \pm 4,25$	0,71
12	Palmitoyl-	$2,36 \pm 0,62$	$6,13 \pm 0,99$	$7,41 \pm 0,18$	$51,01 \pm 6,53$	5,29

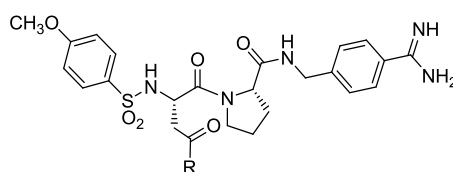
^[a] Der IC₂₀₀-Wert gibt die Inhibitorkonzentration an, die eine Verdopplung der normalen Gerinnungszeit auf 200 % bewirkt.

Neben den K_i -Bestimmungen wurden die Gerinnungshemmwirkungen der freien Inhibitoren **7, 9-12** und **17-19** mittels der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) in humanem

Plasma ermittelt. Die erhaltenen IC_{200} -Werte sind in den **Tabellen 2** und **3** angegeben. Dabei wurde eine gute Korrelation zwischen den Werten der enzymkinetischen Thrombinhemmung und der Gerinnungshemmaktivitäten im Plasma gefunden. Die Inhibitoren mit kleineren K_i -Werten zeigten auch stärkere gerinnungshemmende Eigenschaften. Auf die Ergebnisse der aPPT-Messungen wird nochmals im **Abschnitt 5.6** näher eingegangen.

Tabelle 3. Hemmwirkungen der Inhibitoren mit Asp bzw. Asn in P3-Position.

Nr.	R	K_i				aPTT
		Thrombin (nM)	FXa (μ M)	Plasmin (μ M)	uPA (μ M)	IC_{200} (μ M)
15	OH	1,6	$5,62 \pm 0,25$	$17,92 \pm 1,32$	$26,92 \pm 1,43$	-
17	Tota-	$0,41 \pm 0,02$	$6,02 \pm 0,98$	$18,32 \pm 1,52$	$26,42 \pm 1,94$	0,05
18	Palmitoyl-Tota-	$0,87 \pm 0,06$	$4,73 \pm 0,20$	$17,99 \pm 1,65$	$28,32 \pm 1,26$	0,09
19	Biotinyl-Tota-	$0,35 \pm 0,06$	$3,67 \pm 0,29$	$23,64 \pm 1,75$	$56,25 \pm 1,20$	0,1



5.2.2 Substratanaloge Inhibitoren mit D-Cha in P3-Position

Aus der Literatur sind zahlreiche substratanaloge Hemmstoffe trypsinartiger Serinproteasen bekannt, die eine D-konfigurierte Aminosäure in P3-Position besitzen. Beispielsweise war es nach Einbau von D-Serin möglich, hochwirksame Hemmstoffe der Urokinase zu erhalten [157, 176]. Verbindungen mit Derivaten des D-Homophenylalanins erwiesen sich als potente FXa-Inhibitoren, [177] und D-Tryptophan- oder D- α -Naphthylalanin-Verbindungen dienten zur Entwicklung von Hemmstoffen des Gerinnungsfaktors VIIa [178]. Für die Entwicklung von Thrombinhemmstoffen hat sich der Einbau des D-Phenylalanins und einiger abgeleiteter Derivate als besonders günstig erwiesen. So bewirkt der Ersatz des D-Phenylalanins durch das noch deutlich hydrophobere D-Cyclohexylalanin eine Verstärkung der Thrombinhemmung um den Faktor 10; deshalb wurde diese Aminosäure für eine weitere Verbin-

dungsserie genutzt. Die Inhibitoren mit D-Cha in P3-Position wurden N-terminal mit aromatischen oder aliphatischen Sulfonylresten modifiziert, wobei das bereits oben beschriebene Pro-4-Amba als konstantes P2-P1-Segment beibehalten wurde. Die Hemmkonstanten der synthetisierten Inhibitoren sind in den **Tabellen 4** und **5** zusammengefasst. Die Verbindungen **25**, **26**, **28** und **33**, **34**, **36** sind von der Grundstruktur para/meta-Nitro/Amino-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba abgeleitet und hemmen Thrombin mit K_i -Werten im subnanomolaren Bereich. Generell ist dieser Verbindungstyp etwas weniger spezifisch als die zuvor beschriebenen Inhibitoren mit L-konfiguriertem Lys oder Asp als P3-Rest. So hemmen einige Derivate den Gerinnungsfaktor FXa im zweistellig nanomolaren Bereich und inhibieren auch Plasmin und uPA mit Hemmkonstanten $< 1 \mu\text{M}$. Bei den palmitoylierten Verbindungen **29** und **37** wird die Hemmaktivität sowohl für Thrombin als auch für FXa im Vergleich zu den direkten Analoga **28** und **36** ohne Acylrest deutlich reduziert.

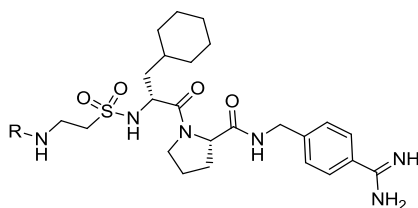
Tabelle 4. Hemmwirkung der Inhibitoren mit aromatischen Sulfonylresten in P4- und D-Cha in P3-Position.

Nr.	R	K_i			
		Thrombin (nM)	FXa (nM)	Plasmin (nM)	uPA (nM)
25	3-NO ₂ -bzls-	0,067 ± 0,016	29,67 ± 3,69	225 ± 49	172 ± 14
26	3-NH ₂ -bzls-	0,065 ± 0,004	7,40 ± 1,23	224 ± 21	140 ± 11
28	Adoa-3-NH-bzls-	0,087 ± 0,006	20,06 ± 3,00	260 ± 17	534 ± 101
29	Palmitoyl-Adoa-3-NH-bzls-	1,19 ± 0,07	122,53 ± 13,78	2260 ± 172	1054 ± 113
33	4-NO ₂ -bzls-	0,062 ± 0,008	19,75 ± 3,42	219 ± 47	292 ± 63
34	4-NH ₂ -bzls-	0,095 ± 0,009	14,10 ± 2,65	254 ± 55	209 ± 49
36	Adoa-4-NH-bzls-	0,16 ± 0,02	23,41 ± 3,78	319 ± 272	493 ± 36
37	Palmitoyl-Adoa-4-NH-bzls-	0,98 ± 0,08	187,36 ± 9,61	2543 ± 302	1833 ± 138

Die analogen Verbindungen mit dem aliphatischen P4-Sulfonylrest Taurin (**Tabelle 5**) sind – im Vergleich zu den Derivaten mit aromatischen Sulfonylresten – etwa 10-fach weniger wirksame Hemmstoffe aller geprüften Proteasen. Jedoch hemmen diese Verbindungen Thrombin immer noch relativ stark mit Hemmkonstanten um 1 nM.

Tabelle 5. Hemmwirkungen der Inhibitoren mit aliphatischen Sulfonylresten in P4- und D-Cha in P3-Position.

Nr.	R	K_i			
		Thrombin (nM)	FXa (nM)	Plasmin (nM)	uPA (nM)
41	Cbz-	$0,89 \pm 0,05$	350 ± 21	239 ± 27	435 ± 14
42	H	$1,24 \pm 0,06$	596 ± 40	255 ± 32	622 ± 94
44	Adoa-	$0,72 \pm 0,06$	620 ± 53	239 ± 27	891 ± 72
45	Palmitoyl-Adoa-	$3,6 \pm 0,9$	937 ± 61	2034 ± 425	9256 ± 1215



5.3 Herstellung der gerinnungshemmenden Liposomen

Aufgrund der besseren synthetischen Zugänglichkeit im Vergleich zu den Asn-Derivaten wurden die palmitoylierten Inhibitoren **10** und **12** mit Lysin in P3-Position zur Herstellung der antikoagulativ-wirksamen Liposomen verwendet. Die Präparation der Liposomen wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Bakowsky nach der sogenannten Filmmethode [179, 180] aus einer Mischung von 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), von Cholesterol (CH) und von den palmitoylierten Inhibitoren **10** oder **12** im Verhältnis 65/30/5 Mol-% durchgeführt. Außerdem wurden bifunktionalisierte Liposomen hergestellt, die neben den Inhibitoren **10** oder **12** zusätzlich noch das Biotinderivat **21** auf ihrer Oberfläche enthalten (**Abb. 17**). In diesem Fall wurde neben DPPC, CH und den Inhibitoren **10** oder **12** zusätzlich noch das Biotinderivat **21** zur Herstellung der Liposomen verwendet.

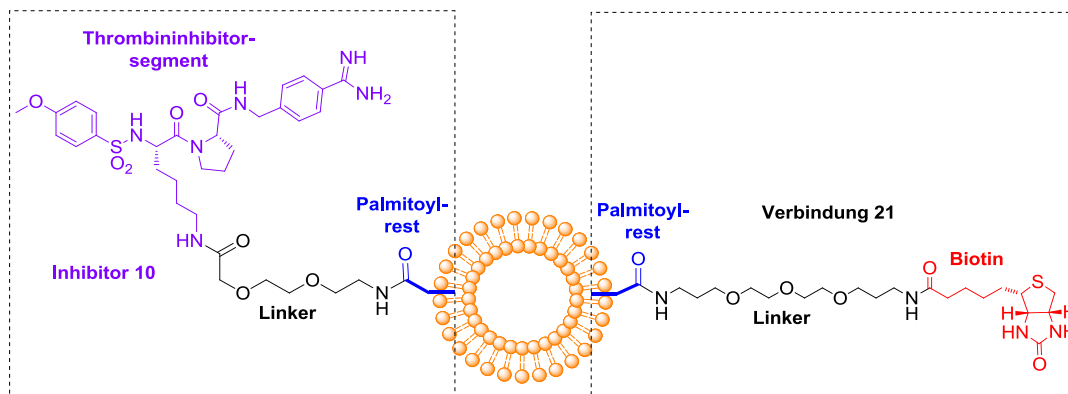


Abbildung 17. Schematische Darstellung eines bifunktionalisierten Liposoms. Diese Art von Liposomen enthalten neben dem Inhibitor **10** auch das Biotinderivat **21** auf ihrer Oberfläche.

Der Einbau des zusätzlichen Biotins sollte zwei unterschiedlichen Zwecken dienen. Dieses Biotinderivat sollte eine Neutralisierung der gerinnungshemmenden Wirkung der Liposomen mittels Avidin ermöglichen; gleichzeitig sollte es die Bindung von Liposomen an Streptavidin-Oberflächen gestatten, um mittels Surface-Plasmon-Resonanz (SPR) spezifische Bindungsstudien mit den Liposomen durchführen zu können (**Abschnitt 5.8**). Die Konzentration der Verbindung **21** in der Lipidmischung betrug dabei 10 Mol % bezogen auf die verwendete Konzentration der Inhibitoren **10** oder **12**. Der Überstand aller Lipidformulierungen wurde mittels HPLC und MS analysiert. Mit den verfügbaren Geräten konnten keinerlei freie Inhibitoren **10** oder **12** in den Überständen der Liposomen nachgewiesen werden. Die Überstände wurden auch enzymkinetisch geprüft, wobei keinerlei Thrombinhemmwirkung gefunden wurde. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Inhibitoren während der Herstellung der Liposomen nahezu komplett eingebaut wurden. Daneben wurden auch die Inhibitoren **37** und **45** mit einem D-Cha als P3-Rest in Kombinationen mit einem aromatischen oder aliphatischen Sulfonylrest für die Herstellung monofunktionalisierter Liposomen verwendet. Wie zuvor beschrieben, wurden auch diese Liposomen mit der Filmmethode hergestellt.

5.4 Physikochemische Charakterisierung der Liposomen

Die hydrodynamischen Durchmesser und Zetapotentiale der hergestellten Liposomen sind in **Tabelle 6** zusammengefasst. Für die unmodifizierten DPPC/CH-Liposomen wurde nur ein leicht negatives Zetapotential von etwa -8 mV bestimmt, da die negativ geladenen Phosphorsäureestergruppen im DPPC größtenteils zwitterionenartige Strukturen mit dem quarternärem Cholinrest ausbilden und so weitestgehend neutralisiert werden. Im Vergleich zu den inhibitorfreien Lipidformulierungen (DPPC/CH) besitzen sowohl die mono- als auch die bifunktionalisierten Liposomen ein signifikant erhöhtes positives Zetapotential. Dies weist darauf hin, dass die Inhibitoren mit der positiv geladenen Benzamidingruppe in signifikanter Menge in die äußere Liposomenmembran eingebaut wurden und dadurch auf der Liposomenoberfläche präsentiert werden. Offenbar reicht die eingesetzte Inhibitormenge aus, um die leicht negative Ladung der unbeladenen Liposomen in den positiven Bereich zu verschieben.

Tabelle 6. Zusammensetzung, Partikelgröße und Zetapotential der hergestellten Liposomen.

Liposomen	Zetapotential (mV)	Partikelgröße ^[a] (nm)
DPPC/CH	-8,60 ± 3,13	75,27 ± 15,96
DPPC/CH/ 21	-6,59 ± 2,32	-
DPPC/CH/ 10	+29,74 ± 10,05	353,27 ± 159,14
DPPC/CH/ 12	+23,56 ± 4,79	330,35 ± 124,12
DPPC/CH/ 10/21	+29,95 ± 11,43	392,78 ± 191,37
DPPC/CH/ 12/21	+37,18 ± 16,19	343,23 ± 181,85
DPPC/CH/ 37	+42,43 ± 16,19	1163,33 ± 17,24
DPPC/CH/ 45	+41,67 ± 16,19	939,27 ± 102,79

^[a] Die Werte wurden aus jeweils drei unabhängigen Messungen ermittelt und sind jeweils als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Bei den bifunktionalisierten Liposomen wurde das Zetapotential durch das zusätzliche neutrale Biotinderivat **21**, das nur in sehr geringen Mengen bei der Herstellung zugesetzt wurde, kaum beeinflusst. Außerdem wurde bei allen modifizierten Liposomen eine deutliche

Zunahme der Partikelgröße beobachtet. Interessanterweise sind die inhibitorfreien Liposomen (DPPC/CH) mit Partikelgrößen von rund 75 nm deutlich kleiner als die mit den Thrombininhibitoren **10/12** und dem Biotinderivat **21**, deren Größen im Bereich von 330 bis 392 nm liegen. Auch für die Liposomen mit den Thrombininhibitoren **37** oder **45** wurde ein positives Zetapotential bestimmt. Allerdings wurde für diese Lipidformulierungen eine signifikant erhöhte Partikelgröße um etwa 1000 nm ermittelt. Dieser Wert ist dreimal so groß im Vergleich zu den Werten der zuvor beschriebenen Liposomen mit den Inhibitoren **10** oder **12**. Die Ursachen dafür sind unklar; möglicherweise kommt es jedoch zur Ausbildung von Aggregaten durch Wechselwirkungen zwischen den stark hydrophoben Seitenketten des D-Cyclohexylalanins.

Zusätzlich zu den Messungen der Dynamischen Lichtstreuung, wurden AFM-Aufnahmen der Liposomen angefertigt, um mit einer weiteren Methode die Größe der Lipidformulierungen zu bestimmen und deren Morphologie zu visualisieren. Die Aufnahmen sind in *Abb. 18* zu sehen.

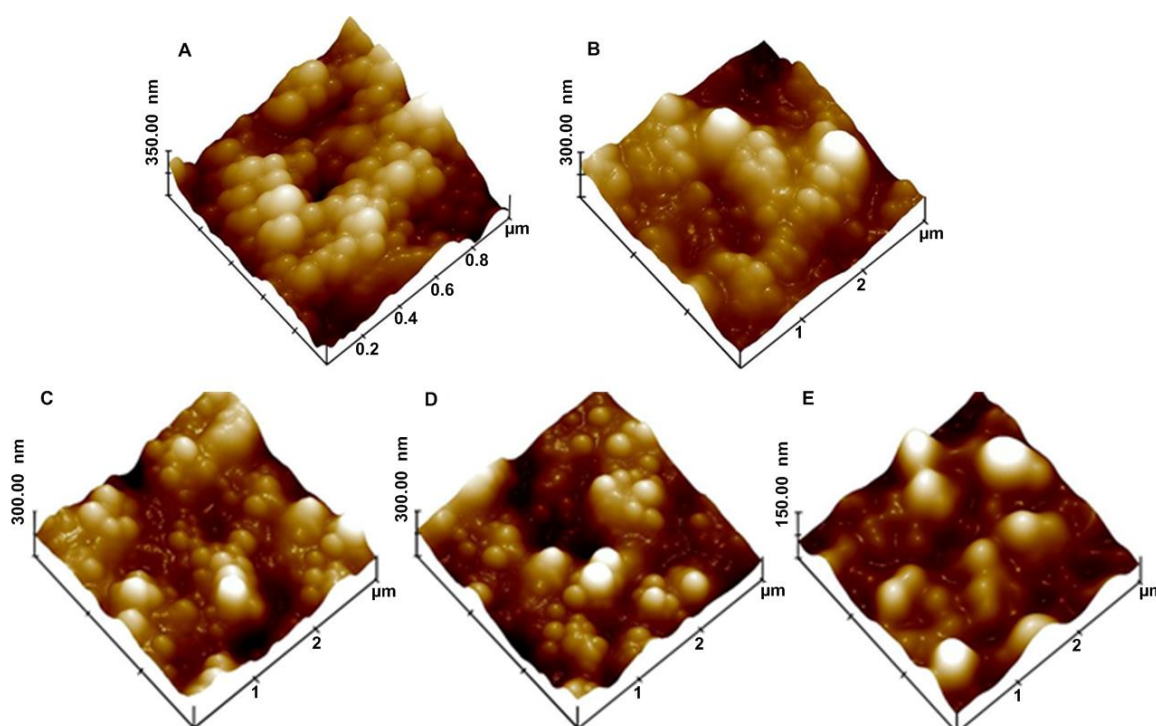


Abbildung 18. AFM-Bilder der Lipidformulierungen. (A) DPPC/CH; (B) DPPC/CH/10; (C) DPPC/CH/12; (D) DPPC/CH/10/21; (E) DPPC/CH/12/21.

Für die DPPC/CH-Liposomen wurde eine monomodale Größenverteilung ermittelt. Diese Liposomen sind sphärisch aufgebaut und besitzen eine Größe von etwa 78 ± 11 nm (**Abb. 18 A**). Die durch AFM bestimmten Größen der monofunktionalisierten Liposomen ähneln denen der DLS-Messung. Diese Liposomentypen sind ebenfalls sphärisch aufgebaut (**Abb. 18 B und C**). Für die Liposomen der Zusammensetzung DPPC/CH/**10** und DPPC/CH/**12** wurden Größen von etwa 324 ± 65 nm sowie 335 ± 87 nm gemessen. Die bifunktionalisierten Liposomen DPPC/CH/**10/21** und DPPC/CH/**12/21** sind mit etwa 370 ± 60 nm oder 390 ± 70 etwas größer. Sowohl bei den mono- als auch bei den bifunktionalisierten Liposomen wurde eine Aggregation der Partikel beobachtet, wobei dieser Effekt bei den DPPC/CH/**12** Formulierungen stärker ausgeprägt war.

5.5 Hemmwirkungen der Liposomen

Die Hemmwirkungen der Lipidformulierungen gegenüber Thrombin wurden enzymkinetisch mit dem fluorogenen Substrat Tos-Gly-Pro-Arg-AMC bestimmt (**Abb. 19 - 20**). Für die Liposomen mit den Inhibitoren **37** und **45** wurden zusätzlich noch die Hemmwirkungen auf FXa ermittelt, da die freien Inhibitoren auch eine gewisse FXa-Inhibierung gezeigt hatten (**Abb. 21**). Die erhaltenen Ergebnisse sind als IC_{50} -Werte in **Tabelle 7** zusammengefasst.

Neben den Hemmwirkungen der Liposomen gegenüber Thrombin oder FXa wurden auch deren gerinnungshemmende Aktivitäten mittels des aPTT-Tests im Plasma bestimmt. Die ermittelten IC_{200} -Werte sind ebenfalls in der **Tabelle 7** angegeben. Auf die Ergebnisse des aPTT-Gerinnungstests wird jedoch erst im **Abschnitt 5.6** eingegangen.

Tabelle 7. Zusammensetzung, Thrombin- und FXa-Hemmung sowie Gerinnungshemmung der hergestellten Liposomen.

Liposomen	IC ₅₀ (nM) ^[a, b]		aPTT IC ₂₀₀ (μM)
	Thrombin	FXa	
DPPC/CH ^[c]	-	-	-
DPPC/CH/ 21 ^[c]	-	-	-
DPPC/CH/ 10	0,55 ± 0,03	n.b.	1,61
DPPC/CH/ 12	81 ± 8,09	n.b.	7,26
DPPC/CH/ 10/21	4,0 ± 0,24	n.b.	2,16
DPPC/CH/ 12/21	116 ± 14,4	n.b.	7,97
DPPC/CH/ 37	4,43 ± 1,03	276 ± 18	1.91
DPPC/CH/ 45	13,79 ± 1,97	1910 ± 80	2.46

n.b. nicht bestimmt. ^[a] Die Werte wurden aus jeweils drei unabhängigen Messungen ermittelt und sind jeweils als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. ^[b] Die IC₅₀-Werte wurden aus enzymkinetischen Messungen mit den fluorogenen Substraten Tos-Gly-Pro-Arg-AMC (Thrombin) und Mes-D-Arg-Pro-Arg-AMC (FXa) ermittelt. ^[c] Die inhibitorfreien DPPC/CH- und DPPC/CH/**21**-Liposomen zeigten keinerlei Thrombin- und Gerinnungshemmung.

Die in **Abb. 19 - 21** auf der X-Achse angegebene Inhibitorkonzentration basiert auf der gesamten Inhibitormenge, die für die Herstellung der Liposomen eingesetzt wurde. Dabei wurde angenommen, dass der eingesetzte palmitoylierte Inhibitor komplett eingebaut und gleichmäßig auf der Liposomenoberfläche verteilt ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein Anteil der Inhibitmoleküle in umgekehrter Weise in die innere Liposomenmembran eingebaut wurde und demzufolge nicht auf der Oberfläche präsentiert wird. In diesem Fall wäre der Inhibitorkopf nicht mehr für Thrombin oder FXa zugänglich.

Die monofunktionalisierten Liposomen aus DPPC/CH und dem Inhibitor **10** mit dem Ado-Spacer besitzen eine starke Thrombinhemmwirkung (IC₅₀ = 0,55 nM), während für die Lipidvesikel mit dem Inhibitor **12** ohne Spacer eine erheblich reduzierte Hemmaktivität gefunden wurde (IC₅₀ = 81 nM). Dies verdeutlicht, dass der Einbau eines flexiblen Linkers zwischen dem Inhibitorkopf und der Liposomenoberfläche notwendig ist, um eine bessere Zugänglichkeit des Thrombins zu ermöglichen.

Die bifunktionalisierten Lipidformulierungen der Zusammensetzung DPPC/CH/**10/21** und DPPC/CH/**12/21** besitzen nur eine leicht reduzierte Thrombinhemmwirkung im Vergleich

zu den monofunktionalisierten Vesikeln ohne Biotinderivat. So wurden für diese Liposom-Typen jeweils IC_{50} -Werte von 4 nM oder 116 nM bestimmt (*Tabelle 7*). Auch in diesem Falle haben sich die Lipidformulierungen mit Inhibitor **10**, ausgestattet mit Adoa-Spacer, als deutlich wirksamer erwiesen als die entsprechenden Analoga mit Inhibitor **12** ohne Spacer.

Die monofunktionalisierten DPPC/CH/**37** oder DPPC/CH/**45**-Formulierungen enthalten den zweiten Inhibitor-Typ mit D-Cycloheylalanin in P3-Position. Daher sind diese Liposomen weniger spezifisch und hemmen neben Thrombin auch noch den Faktor Xa, wenn auch deutlich schwächer (*Tabelle 7*). Die zusätzliche FXa-Hemmung kann möglicherweise die Wirksamkeit dieser Liposomen erhöhen. Die DPPC/CH/**45**-Formulierungen, welche die Verbindung mit dem aliphatischen P4-Sulfonylrest Taurin enthalten, sind ungefähr dreifach weniger wirksame Thrombinhemmstoffe im Vergleich zu denjenigen DPPC/CH/**37** Liposomen mit dem Inhibitor, der einen aromatischen P4-Sulfonylrest besitzt.

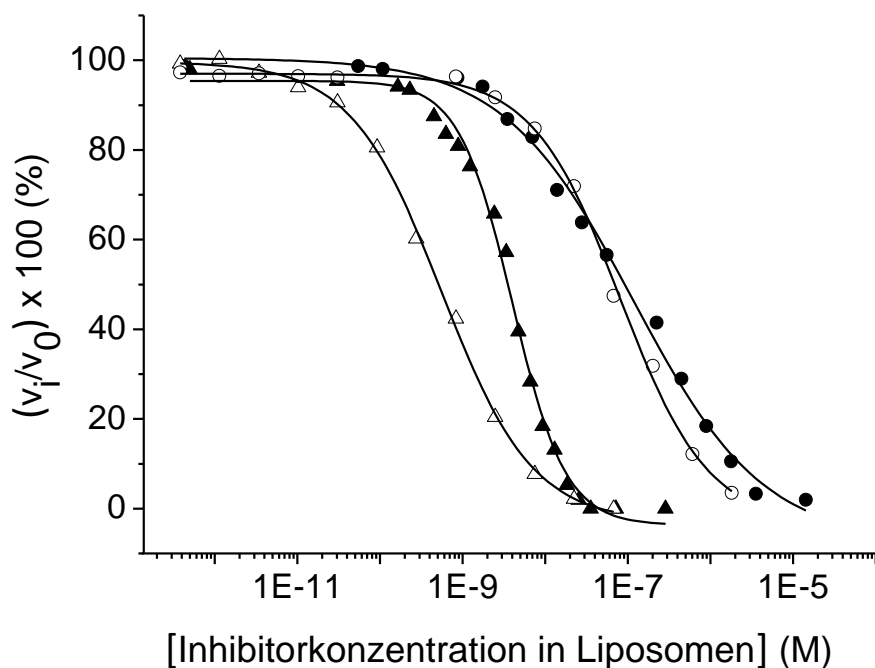


Abbildung 19. Hemmung der thrombinkatalysierten Spaltung des fluorogenen Substrats Tos-Gly-Pro-Arg-AMC (10,9 μ M) durch verschiedene Liposomen (DPPC/CH/**10** (△), DPPC/CH/**12** (○), DPPC/CH/**10/21** (▲) und DPPC/CH/**12/21** (●)). Die Inhibitorkonzentration auf der X-Achse bezieht sich auf die für die Liposomenherstellung verwendete Gesamtmenge der Inhibitoren, wobei angenommen wurde, dass die Inhibitoren vollständig in die äußere Liposomenmembran eingebaut wurden.

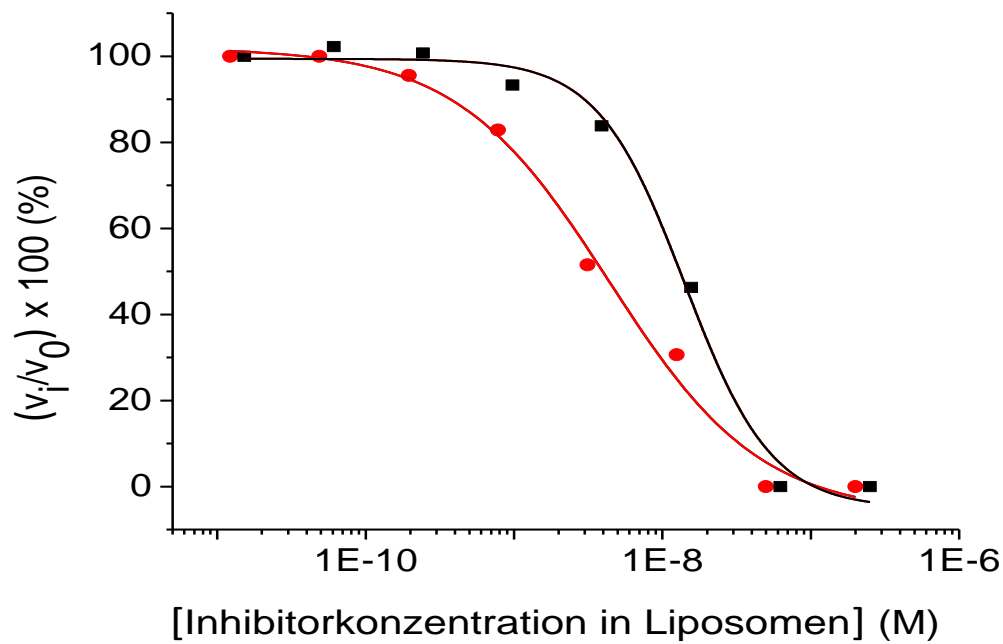


Abbildung 20. Hemmung der thrombinkatalysierten Spaltung des fluorogenen Substrats Tos-Gly-Pro-Arg-AMC (10,9 μM) durch die monofunktionalisierten Liposomen: DPPC/CH/37 (●) und DPPC/CH/45 (■).

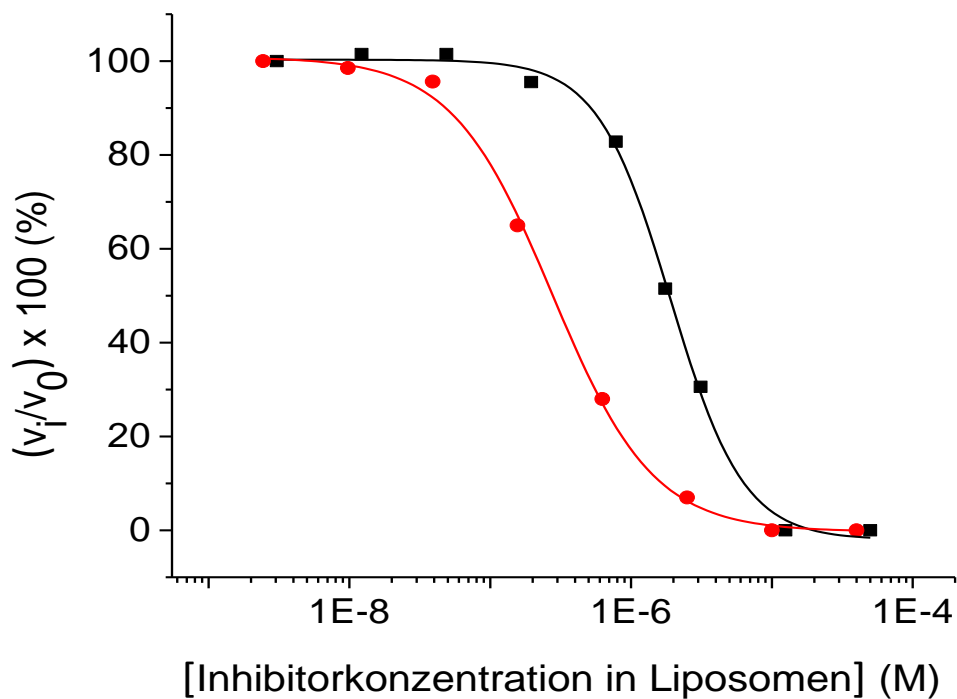


Abbildung 21. Hemmung der FXa-katalysierten Spaltung des fluorogenen Substrats Mes-D-Arg-Pro-Arg-AMC (50 μM) durch die monofunktionalisierten Liposomen: DPPC/CH/37 (●) und DPPC/CH/45 (■).

5.6 Gerinnungshemmung im Plasma

Die gerinnungshemmenden Aktivitäten der freien Hemmstoffe **7**, **9-12** und **17-18** sowie der mit verschiedenen Inhibitoren funktionalisierten Liposomen wurden mittels der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) bestimmt. Die aPPT-Messung erlaubt, die Hemmwirkung auf die intrinsische Gerinnungskaskade zu untersuchen (**Abb. 22**). Die ermittelten IC_{200} -Werte der gerinnungshemmenden Liposomen sind in **Tabelle 7** zusammengefasst. Der IC_{200} -Wert gibt die Inhibitorkonzentration an, die eine Verdopplung der Gerinnungszeit auf 200 % bewirkt. Hierbei wurde angenommen, dass die für die Herstellung der Liposomen eingesetzte Inhibitormenge komplett in die äußere Liposomenmembran eingebaut wurde.

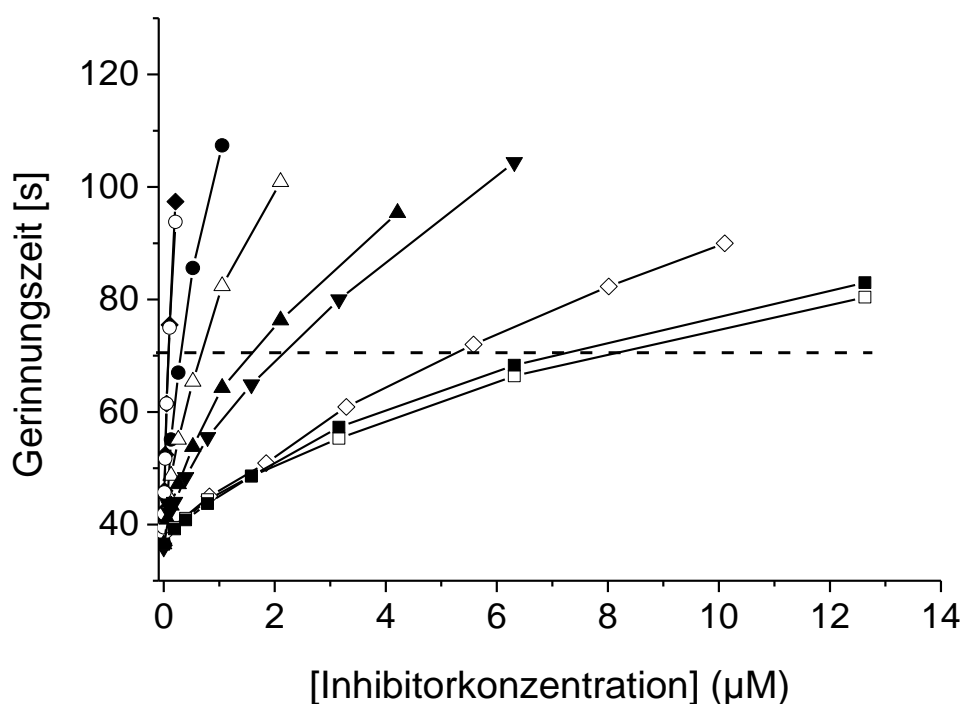


Abbildung 22. Gerinnungshemmung freier Inhibitoren und ausgewählter Liposomen im aPTT-Test. Verwendete Inhibitoren mit Lys in P3-Position (**7** (◆), **9** (○), **11** (●), **10** (△), **12** (◇)); mono-funktionalisierte Liposomen (DPPC/CH/**10** (▲) und DPPC/CH/**12** (■)); bifunktionalisierte Liposomen (DPPC/CH/**10/21** (▼) und DPPC/CH/**12/21** (□)). Aus dem X-Wert der Schnittpunkte der gestrichelten Linie mit der jeweiligen Kurve kann der IC_{200} -Wert bestimmt werden, der die Konzentration angibt, die eine Verdopplung der Gerinnungszeit im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor bewirkt.

Die freien Inhibitoren **7** und **9** besitzen eine sehr starke gerinnungshemmende Wirkung mit IC_{200} -Werten von 0,1 μ M oder 0,12 μ M. Eine leicht reduzierte Aktivität wurde für die palmitoylierten und biotinylierten Lys-Derivate **10** bzw. **11** bestimmt, wohingegen der

Inhibitor **12** ohne den Adoa-Spacer lediglich eine relativ schwache Hemmwirkung mit einem IC_{200} -Wert von 5,29 μM besitzt.

Die Lipidformulierungen, die den mit einem Ethylenglykol-Spacer ausgestatteten Inhibitor **10** enthalten, weisen im Vergleich zu Liposomen mit dem Inhibitor **12** ohne Spacer deutlich stärkere Hemmaktivitäten auf. So wurden für Liposomen der Zusammensetzung DPPC/CH/**10** und DPPC/CH/**10/21** jeweils IC_{200} -Werte von 1,61 μM und 2,16 μM ermittelt (*Tabelle 7*), während der IC_{200} -Wert der DPPC/CH/**12**-Liposomen bei 7 μM liegt. Für die Liposomen mit den Typ II-Inhibitoren DPPC/CH/**37** oder DPPC/CH/**45** wurden jeweils IC_{200} -Werte von 1,91 μM und 2,46 μM bestimmt (*Tabelle 7*). Auch in diesem Fall wurde eine Korrelation zwischen den Werten der Enzymkinetik und der Gerinnungsmessung im Plasma gefunden, obwohl die IC_{50} -Werte deutlich über den K_i -Werten liegen. Während bei den enzymkinetischen Messungen Thrombinkonzentrationen im picomolaren Bereich eingesetzt werden, liegt die Prothrombinkonzentration im Plasma bei ca. 1,4 μM . Allerdings ist hier zu betonen, dass das Prothrombin sicher nicht vollständig aktiviert wird. Da die Inhibitoren im Verhältnis 1:1 an Thrombin binden, liegen die IC_{200} -Werte deutlich höher als die K_i -Werte.

5.7 Neutralisierung der Thrombinhemmwirkung der DPPC/CH/10/21-Liposomen durch Avidin

Im Falle von Blutungskomplikationen ist es für Hemmstoffe der Blutgerinnung von großem Vorteil, wenn ein spezifisches Mittel zur Aufhebung der gerinnungshemmenden Wirkung zur Verfügung steht. Ein Beispiel hierfür ist Idarucizumab, ein monoklonaler Antikörper, der ein spezifisches Dabigatran-Antidot darstellt und der Ende des Jahres 2015 seine Zulassung erhielt. In früheren Arbeiten berichteten Olson und Kollegen über den chimären und neutralisierbaren Gerinnungshemmstoff EP217609 [181], bei dem die trifunktionelle Aminosäure Lysin ausgehend von ihrer α -Aminogruppe über einen γ -Aminobuttersäurerest mit der Asp-Seitenkette des direkten Thrombininhibitors CRC220 verknüpft ist. C-terminal wurde an das Lysin über einen Ethylenglykol-Spacer ein synthetisches Pentasaccharid gekoppelt, das vom Idraparinux abgeleitet wurde und das die FXa-Hemmung durch den körpereigenen Hemmstoff Antithrombin verstärkt und seine Halbwertszeit verlängert. Als dual wirksames Antikoagulanz ist EP217609 in der Lage, sowohl Thrombin als auch indirekt

die FXa-Aktivität zu hemmen; dieses Wirkstoffkonstrukt zeigte im Tiermodell eine starke, lang anhaltende gerinnungshemmende Aktivität mit einer vorhersagbaren Pharmakokinetik. Darüber hinaus wurde an der Lysin-Seitenkette ein Biotinrest gekoppelt, welcher eine Neutralisierung der gerinnungshemmenden Aktivität des Wirkstoffs durch Zugabe von Avidin (Antidot) ermöglicht. So konnte die gerinnungshemmende Aktivität beider Kopfgruppen dieser Verbindung durch Zugabe von Avidin um den Faktor 20-100 abgeschwächt werden. In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation versucht, ein generelles Antidot-Prinzip für wirkstoffbeladene Liposomen zu entwickeln. Für diesen Zweck wurden bifunktionalisierte Liposomen hergestellt, die neben den Inhibitoren **10** oder **12** auch das Biotinderivat **21** auf ihrer Oberfläche aufweisen (**Abschnitt 5.3**). Die freien biotinylierten Inhibitoren **11** und **19** wurden für diese Untersuchung als Referenzverbindungen eingesetzt.

Um die Neutralisierbarkeit der gerinnungshemmenden Aktivität zu untersuchen, wurde zuerst die Konzentration der Inhibitoren **11**, **19** oder der DPPC/CH/**10/21**-Liposomen bestimmt, welche die Thrombinrestaktivität im enzymkinetischen Assay auf etwa 10 % reduziert. Diese zuvor ermittelten Konzentrationen wurden in den Messungen mit Avidin eingesetzt. Hierbei wurde Avidin zum Messansatz zugesetzt, welcher die jeweiligen Inhibitoren oder bifunktionalisierten Liposomen in zuvor ermittelten Konzentrationen enthält. Anschließend wurde die durch die Avidinzugabe bewirkte Reduktion der Thrombinhemmung als Anstieg der Thrombinrestaktivität gemessen (**Abschnitt 7.5** im Methodenteil).

Die Zugabe von Avidin zu den DPPC/CH/**10/21**-Liposomen, welche die Verbindung **21** nur in geringen Mengen enthielten (10 Mol %, bezogen auf den Inhibitor **10**), führte nur zu einer geringfügigen Absenkung der Thrombinhemmwirkung; die Restaktivität wurde hierbei lediglich um ca. 5 % auf ca. 15 % erhöht (**Abb. 23**). Daraufhin wurden zusätzliche Lipidformulierungen DPPC/CH/**10/21** hergestellt, welche das Biotinderivat **21** in höheren Konzentrationen (20, 50 und 100 %, bezogen auf den Inhibitor **10**) enthielten. Jedoch wurde auch mit diesen Liposomen nur eine geringfügig stärkere Absenkung der Hemmwirkung bei Zugabe von Avidin erreicht (Erhöhung auf ca. 20 % Restaktivität bei 20 % Verbindung **21** im Vergleich zu Inhibitor **10**; Erhöhung auf ca. 25 % Restaktivität bei 50 % Verbindung **21** im Vergleich zu Inhibitor **10** und Erhöhung auf ca. 35 % Restaktivität bei gleichen Konzen-

trationen an Verbindung **21** und **10**). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass hier mit den verwendeten bifunktionalisierten Liposomen nur eine geringe Antidotwirkung des Avidins nachweisbar war. Die Ursache hierfür könnte in der Instabilität des Liposom-Inhibitor-Biotinderivat-Konstruktes liegen. Eine starke Absenkung der Hemmwirkung wurde für die freien biotinylierten Inhibitoren **11** und **19** ermittelt (Erhöhung der Restaktivität auf ca. 60-70 %). Wie erwartet, blieb die Aktivität der DPPC/CH/10-Liposomen ohne das Biotinderivat **21** (Kontrolle) durch Avidinzugabe unbeeinflusst.

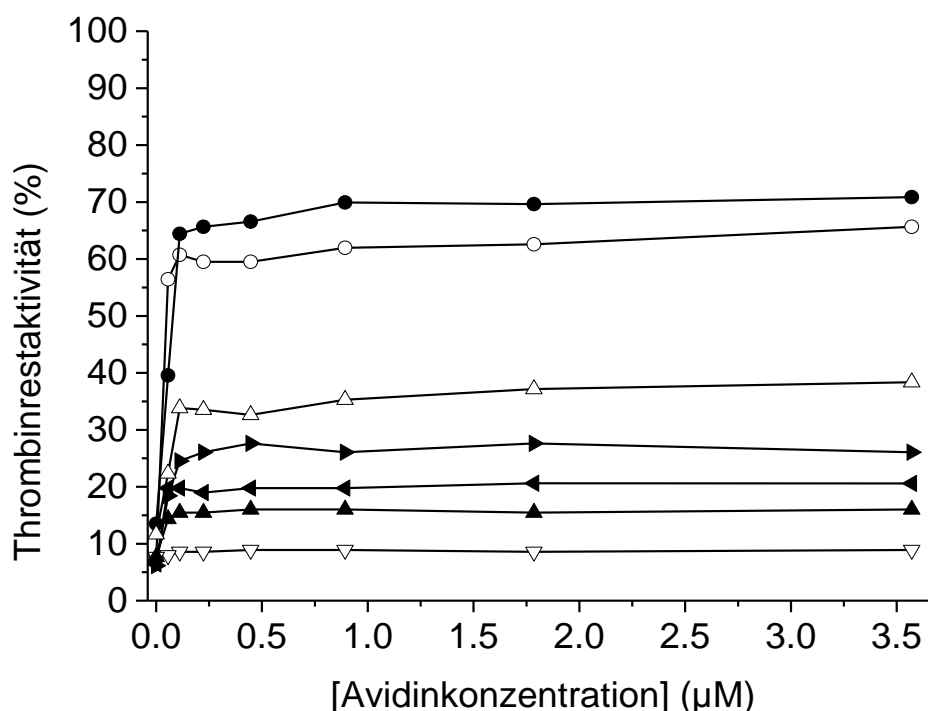


Abbildung 23. Absenkung der Thrombinhemmwirkung durch Zugabe von Avidin. Zugabe von Avidinlösungen verschiedener Konzentrationen zu freien biotinylierten Inhibitoren **11** (●) und **19** (○) sowie zu monofunktionalisierten DPPC/CH/10-Liposomen (▽) und bifunktionalisierten DPPC/CH/10/21-Liposomen, welche die Verbindung **21** bezogen auf den Inhibitor **10** in verschiedenen Konzentrationen enthalten: Die Konzentration der Verbindung **21** (in Molprozent) bezogen auf Inhibitor **10** betrug 10 % (▲), 20 % (◄), 50 % (►) und 100 % (△). Die Messungen wurden mit dem fluorogenen Substrat Tos-Gly-Pro-Arg-AMC (11 µM) in Anwesenheit von 15 pM Thrombin durchgeführt.

5.8 SPR-Bindungsstudien

Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) erlaubt die markierungsfreie Bestimmung kinetischer und thermodynamischer Interaktionseigenschaften zwischen zwei Bindungspartnern. Bei diesem optischen Detektionsverfahren wird ein Bindungspartner (Erkennungsstruktur) auf einer dünnen Goldschicht immobilisiert. Die Bindung eines zweiten Inter-

aktionspartners (Analyt) an den immobilisierten Molekülen führt zu einer Änderung des Brechungsindex, da die Oberfläche optisch dichter wird [182, 183]. Die Änderung des Brechungsindex ist von der Beladung der Goldoberfläche mit Biomolekülen abhängig und wird daher zur zeitaufgelösten Untersuchung und Darstellung von Bindungsvorgängen verwendet. Das Messprinzip beruht auf der Anregung von Elektronenschwingungen auf der Goldschicht durch einfallendes Anregungslicht. Das Licht wird unter dem Winkel θ total reflektiert. Bei einem bestimmten Einfallswinkel nahe θ (Resonanz-winkel) kommt es beim reflektierten Licht zu einem Intensitätsabfall. Dieser Winkel hängt vom Brechungsindex des Systems und somit von der Belegung der Grenzschicht Gold/Medium ab. Für die Kinetikmessung wird der Einfallswinkel α nicht variiert, sondern auf einen bestimmten Winkel fixiert und die Veränderung der Intensität des reflektierten Lichtes gemessen. Die Änderung des SPR-Signals wird in refractive index unit (RIU) als Funktion der Zeit (t) aufgetragen.

SPR-Studien mit DPPC/CH/10/21 Liposomen und dem biotinylierten Inhibitor 11

Die SPR-Bindungsstudien wurden von Dr. Doru Vornicescu in der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Keusgen (Philipps-Universität Marburg) sowohl mit den bifunktionalisierten DPPC/CH/10/21-Liposomen als auch mit dem freien biotinylierten Inhibitor **11** durchgeführt. Die Untersuchungen mit den DPPC/CH/10/21-Liposomen sollten bestätigen, dass die Inhibitoren ebenso wie das Biotinderivat **21** zumindest teilweise, wie gewünscht, auf der Oberfläche der Liposomen lokalisiert sind. Das verwendete Fusionsprotein *Concanavalin A-Streptavidin* (Con A-SA) [184] wurde freundlicherweise von Dr. Nina Dassinger zur Verfügung gestellt. Der Versuchsaufbau wird anhand der biotinylierten Verbindung **11** in **Abb. 24** veranschaulicht.

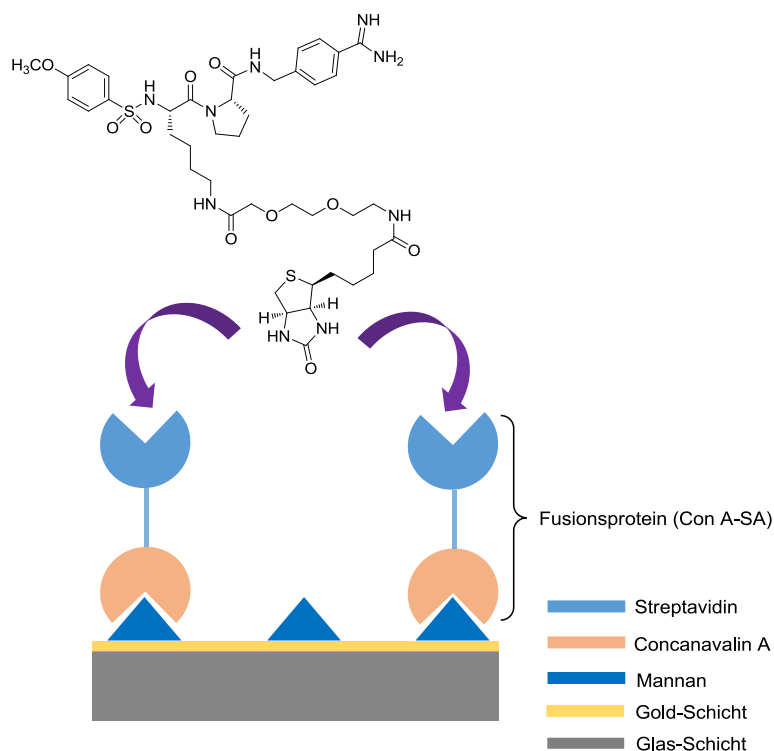


Abbildung 24. Schematischer Aufbau des SPR-Experiments mit dem Inhibitor **11**.

Im ersten Schritt der Untersuchung wurde das Polysaccharid Mannan adsorptiv auf eine Goldoberfläche aufgebracht. Als nächstes wurde das Fusionsprotein *Concanavalin A Streptavidin* (*Con A-SA*) über seinen zuckerbindenden „*Concanavalin A*-Anteil“ an Mannan gebunden. Anschließend erfolgte die Bindung des biotinylierten Inhibitors **11** oder der bifunktionalisierten Liposomen (DPPC/CH/**10/21**) an das Streptavidin des Fusionsproteins. Im letzten Schritt wurde dann Thrombin an den Inhibitor **11** oder an den in der äußeren Liposomenmembran eingebauten Hemmstoff **10** gebunden. Die erhaltenen Sensogramme sind in *Abb. 25* und *26* dargestellt.

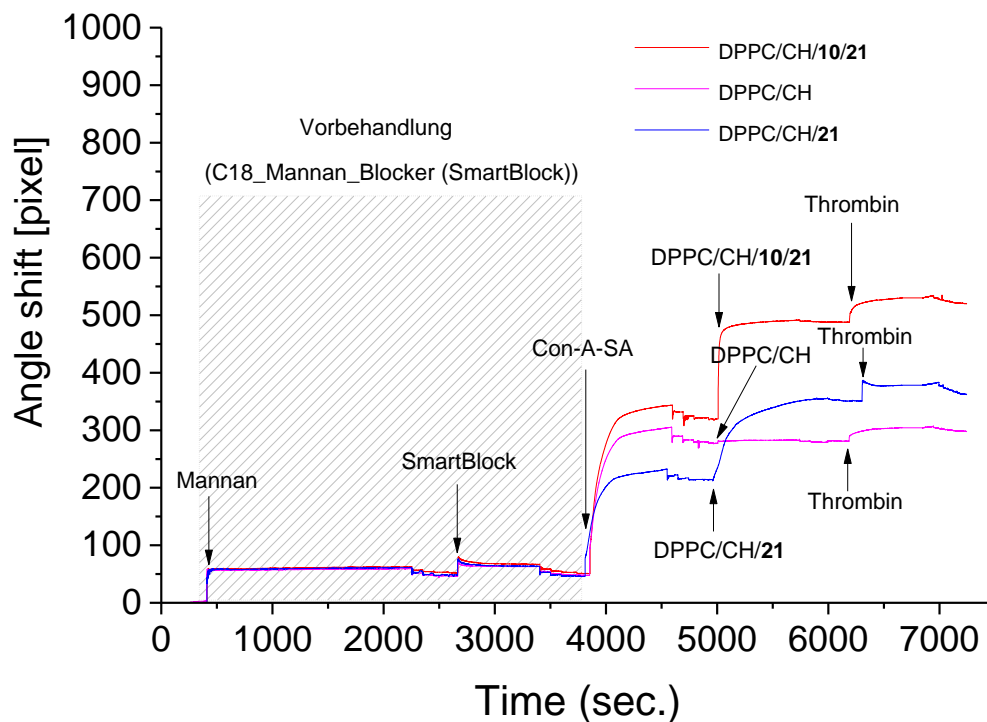


Abbildung 25. Sensogramme der SPR-Bindungsstudien. DPPC/CH (magenta); DPPC/CH/21 (blau); DPPC/CH/21/10 (rot). Als Blockierer wurde „SmartBlock“ von der Firma CANDOR verwendet. Die Blockierung ist notwendig, um die freien Bindungsstellen auf der jeweiligen Oberfläche abzusättigen; dadurch werden bei den nachfolgenden Arbeitsschritten unspezifische Bindungen an die Oberfläche verhindert.

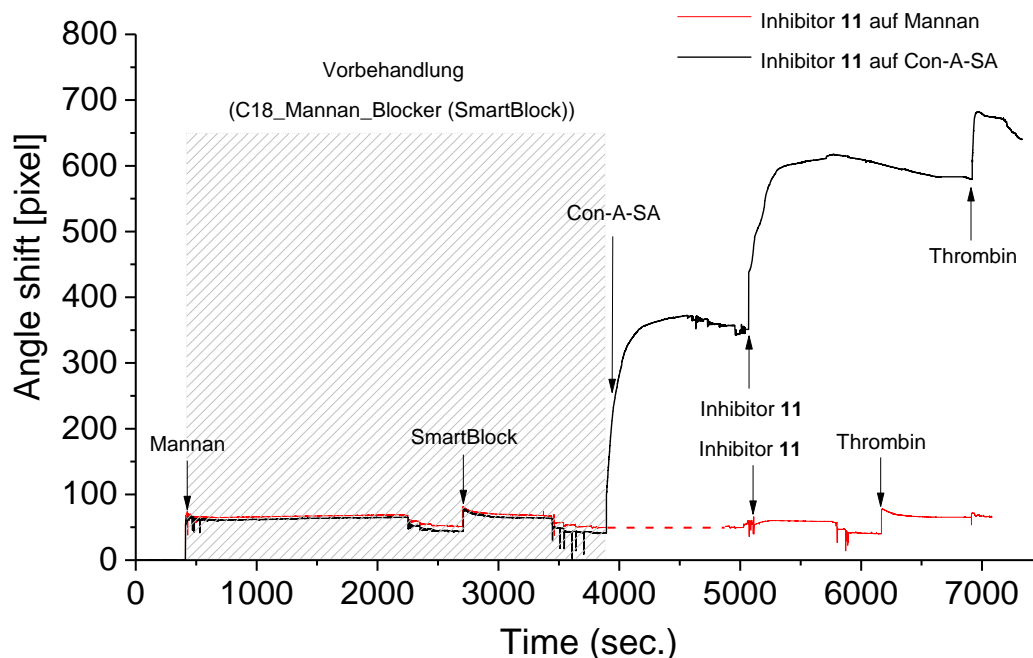


Abbildung 26. Sensogramme der SPR-Bindungsstudien mit dem biotinylierten Inhibitor 11. **Rot**, ohne das Fusionsprotein *Con-A-SA*; **Schwarz**, mit Fusionsprotein. In Abwesenheit des Fusionsproteins ist keine Bindung des Inhibitors möglich.

Als Kontrolle wurden reine DPPC/CH Liposomen eingesetzt, welche nicht in der Lage sind an Streptavidin zu binden, da sie keine Biotinreste auf ihrer Oberfläche besitzen (**Abb. 25**). Als weitere Kontrolle wurden DPPC/CH/**21** Liposomen mit dem palmitoylierten Biotinderivat **21** untersucht. Diese sollten an Streptavidin immobilisiert werden können, jedoch sollten sie kein Thrombin binden, da hier der Thrombininhibitor fehlt. Unerwartet kam es in diesem Fall zu einer geringen unspezifischen Thrombinbindung, deren Ursache unbekannt ist. Da die DPPC/CH/**21** Liposomen ein leicht negatives Zetapotential (-6.59 mV) besitzen, ist eine solche unspezifische elektrostatische Bindung des Thrombins über seine beiden positiv geladenen Anionen-Bindungsstellen denkbar.

Es ist bekannt, dass die Bindung von Liganden, wie dem C-terminalem Hirudin-Fragment (Reste 53-65) nur an diese Anionen-Bindungsseite (ABE-I) keinen hemmenden Einfluss auf die Enzymaktivität besitzt, wenn man kleine Fluoreszenzsubstrate für Messungen nutzt. Interessanterweise bewirkt diese Exosite-Bindung eine Reduktion des K_M -Wertes kleiner tripeptidischer p-Nitroanilin-Substrate, während k_{cat} weitestgehend konstant bleibt [185]. Da das aktive Zentrum des Thrombins relativ weit von der Heparin-Bindungsstelle (ABE-II) entfernt ist, sollte auch eine Blockade dieser positiv geladenen Region, z.B. durch Bindung von schwach negativ geladenen Liposomen, die Aktivität des Thrombins gegenüber kleineren chromogenen oder fluorogenen Substraten kaum beeinflussen. Dies könnte erklären, dass keine Hemmung des Thrombins feststellbar war, wenn blanke DPPC/CH oder DPPC/CH/**21**-Liposomen (ohne den Thrombininhibitor) zu einem enzymkinetischen Messansatz zugesetzt wurden. Dagegen würde eine Blockierung der ABE-I des Thrombins zu einer Gerinnungshemmung führen. Diese Exosite muss für die Bindung des Fibrinogens sowie für die korrekte Erkennung und die anschließende Spaltung im aktiven Zentrum des Thrombins verfügbar sein. Jedoch zeigten die verwendeten Liposomen keinerlei Gerinnungshemmung im aPTT-Test im Plasma; dies deutet darauf hin, dass zwischen diesen leicht negativen Lipidformulierungen und dem am Ende der Gerinnungskaskade generierten Thrombin keine unspezifischen Wechselwirkungen bestehen. Allerdings ist anzumerken, dass eine gerinnungsaktivierende Wirkung dieser Liposomen möglich ist, weil die intrinsische Gerinnungskaskade durch eine negativ geladene Oberfläche aktiviert wird.

Die bifunktionalisierten DPPC/CH/**10/21** Liposomen wurden, wie erwartet, über ihren Biotinrest (Verbindung **21**) an das Streptavidin des Fusionsproteins und über ihren Inhibitoranteil an Thrombin gebunden (**Abb. 25**). Dieses Ergebnis beweist, dass der Inhibitor sowie

auch das Biotinderivat zumindest teilweise auf der Oberfläche der Liposomen in korrekter Orientierung präsentiert werden. Die Durchführung der SPR-Bindungstudien mit dem Inhibitor **11** erfolgte analog der bifunktionalisierten Liposomen. Ein Kontrollexperiment in Abwesenheit des Fusionsproteins zeigte, dass weder der biotinylierte Inhibitor noch das Thrombin unspezifisch an das auf der Sensoroberfläche immobilisierte Mannan gebunden wurden (**Abb. 26**). Die Bindung des Inhibitors war nur dann möglich, wenn zuvor das Fusionsproteins *Con-A-SA* immobilisiert wurde. In Anwesenheit des Fusionsproteins kam es zu einer signifikanten Bindung des biotinylierten Hemmstoffs **11**, an dem wiederum Thrombin gebunden wurde (vgl. **Abb. 26**).

5.9 Kovalente Oberflächenfunktionalisierung

Die Lysin-Verbindung **9** mit freier Aminogruppe am Ethylenglykol-Spacer wurde mittels eines Silanisierungsverfahrens kovalent an einen Glasträger gebunden. Die Silanisierung ist ein bekanntes Verfahren zur Modifizierung von anorganischen, hydroxylgruppenhaltigen Oberflächen wie Glas [186]. In der Regel werden Chlor- und Alkoxysilane eingesetzt, welche unter Abspaltung von Salzsäure bzw. des entsprechenden Alkohols mit den Hydroxylgruppen der Oberfläche reagieren und Silylether bilden. Die Mechanismen wurden in früheren Arbeiten von van der Voort et al. eingehend untersucht [186]. In dieser Arbeit wurde das kommerziell erhältliche 3-Aminopropyl-triethoxysilan (APTMS) als Silanisierungsreagenz verwendet, um Glasträger mit Aminofunktionen auszustatten. Anschließend wurde Inhibitor **9** mit seinen primären Aminogruppen über Cyanurchlorid an Glasoberflächen geknüpft. Die Durchführung des Experiments ist im **Abschnitt 7.8** beschrieben.

Die beschichteten Glasträger wurden auf ihre Thrombinhemmwirkung mit einem enzymkinetischen Messansatz untersucht. In **Abb. 27** sind die bestimmten Restaktivitäten des Thrombins als Funktion der Masse der beschichteten Gläser dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die hergestellten Glasoberflächen eine Thrombinhemmung bewirken, welche mit zunehmender Masse der eingesetzten Gläser stärker wird. Offensichtlich ist der verwendete Adoa-Linker lang genug, um den erforderlichen Abstand zwischen Trägeroberfläche und dem Inhibitorkopf zu gewährleisten, so dass Thrombin gebunden werden kann. Verbindungen wie Inhibitor **9** könnten daher zur kovalenten gerinnungshemmenden

Modifizierung artifizieller Oberflächen, wie künstlicher Herzklappen oder Dialysator-membranen, eingesetzt werden.

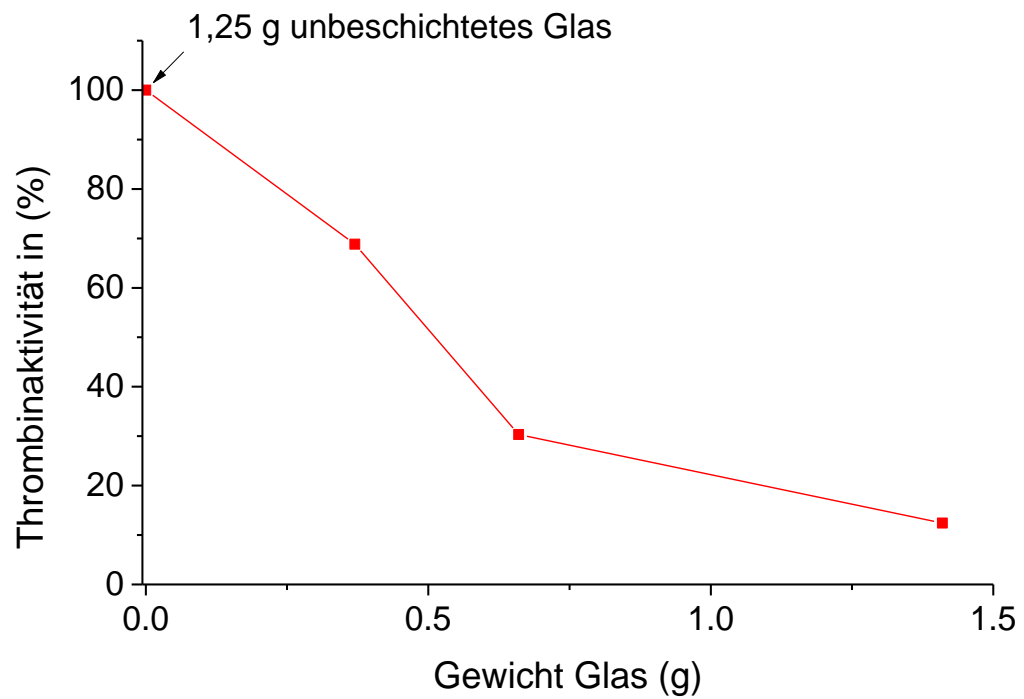


Abbildung 27. Thrombinhemmung der mit dem Inhibitor **9** kovalent beschichteten Gläser. Als Referenz wurde 1,25 g unbeschichtetes Glas verwendet, das wie erwartet keine Thrombinhemmwirkung zeigte.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das therapeutische Potential vieler peptidischer Wirkstoffe ist auf Grund des proteolytischen Abbaus durch körpereigene Proteasen sowie durch rasche renale Eliminierung limitiert. Daher existieren im Vergleich zu den niedermolekularen Wirkstoffen nur relativ wenige für den klinischen Einsatz zugelassene Peptide und Peptidderivate. Jedoch gibt es zahlreiche Strategien, um die proteolytische Stabilität von peptidischen Wirkstoffen zu erhöhen und gleichzeitig deren Eliminierungsgeschwindigkeit zu reduzieren. Zu diesen Strategien gehören N- und C-terminale Modifizierungen der Peptide, der Einbau von D-konfigurierten oder von anderen ungewöhnlichen Aminosäuren sowie der Austausch von Aminosäuren an bevorzugten Spaltstellen. Weitere in der Praxis häufig verwendete Maßnahmen sind die Zyklisierung von Peptiden oder oft auch die Fusion dieser Moleküle mit langlebigen Plasmaproteinen oder Polymeren. Infolgedessen hat sich die Anzahl zugelassener Peptidwirkstoffe in den letzten Jahren etwas erhöht.

Die optimale Strategie zur Halbwertszeitverlängerung von peptidischen Wirkstoffen, die zu schnell renal eliminiert werden, ist bis jetzt noch nicht gefunden. Jedoch sollte solch eine Methode einfach und kostengünstig sein. Eine weitere äußerst wichtige Anforderung ist, dass die Aktivität des Wirkstoffs durch die anzuwendende Methode nicht signifikant beeinträchtigt werden darf.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte am Beispiel hochwirksamer Thrombininhibitoren eine neue, gut zu handhabende Strategie zur Oligomerisierung von Wirkstoffen entwickelt werden. Ein damit verbundenes Ziel war eine Molekulargewichtsvergrößerung, die durch den Einbau der Wirkstoffe in die äußere Liposomenmembran erreicht werden sollte. Die Vergrößerung des hydrodynamischen Radius der Wirkstoffe sollte zu einer deutlichen Einschränkung der renalen Filtration führen. Für diesen Zweck wurden zwei Typen von Inhibitoren hergestellt und mit Fettsäureresten modifiziert. Die Typ-I-Inhibitoren mit L-Aminosäuren in P3-Position hemmen Thrombin sehr spezifisch mit Hemmkonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich. Allerdings besitzen diese Inhibitoren kaum Wirkung auf andere trypsinartige Serinproteasen wie auf den Gerinnungsfaktor FXa sowie auf die fibrinolytischen Proteasen Plasmin oder Urokinase; in allen Fällen liegen die K_i -Werte über 1 μ M. Der zweite Typ von Inhibitoren mit D-Cyclohexylalanin in P3-Position ist weniger spezifisch und hemmt neben Thrombin, wenn auch deutlich schwächer, ebenfalls FXa. Die

Kopplung des Fettsäurerestes erfolgte bei den Typ-I-Inhibitoren an den Seitenketten der P3-Reste, während die Typ-II-Inhibitoren an ihren Sulfonylgruppen in P4-Position modifiziert wurden. Diese Modifizierungen beeinflussten die Thrombinhemmwirkungen kaum. Dadurch gelang es mit beiden Inhibitortypen, stark wirksame Thrombininhibitoren mit Hemmkonstanten im subnanomolaren Bereich zu erhalten.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Bakowsky wurden die palmitoylierten Inhibitoren **10**, **12**, **37** und **45** in die DPPC/CH-Liposomen eingebaut. Diese Liposomen zeigen eine starke Thrombinhemmwirkung in enzymkinetischen Messungen mit einem fluorogenen Substrat und sind auch in einem Plasmagerinnungstest wirksam. Im Vergleich zu den Liposomen, die den Inhibitor **10** mit einem Ethylenglykol-Spacer enthalten, wurde für die Lipidvesikel mit dem verkürzten Inhibitor **12** ohne Spacer eine um den Faktor Hundert reduzierte Hemmwirkung ermittelt. Dies unterstreicht die Notwendigkeit eines ausreichend langen und flexiblen Spacers zwischen dem Inhibitorkopf und der Liposomenoberfläche. Es ist davon auszugehen, dass in Gegenwart des Spacers der Inhibitor besser für Thrombin zugänglich wird und dass sich dadurch eine Reduktion der Hemmwirkung durch sterische Effekte vermeiden lässt. Darüber hinaus sollte durch einen langen, flexiblen Spacer die Bindung mehrerer Thrombinmoleküle an ein Liposom begünstigt werden, was wiederum zu einer stärkeren Hemmwirkung führen sollte.

Im Falle von Komplikationen bei der medikamentösen Behandlung ist es von großem Vorteil, wenn ein spezifisches Mittel zur Aufhebung der jeweiligen unerwünschten Wirkung zur Verfügung steht. Erst kürzlich, im Jahr 2015, erhielt Idarucizumab, ein monoklonaler Antikörper, die Zulassung als ein spezifisches Dabigatran-Antidot, das zur Normalisierung der Gerinnung bei Blutungskomplikationen oder vor Notfalleingriffen verwendet werden kann. Für die oralen FXa-Hemmstoffe wird derzeit ein inaktiviertes FX-Analogon in der klinischen Phase III geprüft.

In dieser Arbeit sollte ein generelles Antidot-Prinzip für Liposomen entwickelt werden. Für diesen Zweck wurden zusätzlich zu den monofunktionalisierten Lipidvesikeln auch bifunktionalisierte Liposomen hergestellt, in deren äußere Lipidmembran, neben den Inhibitoren **10** oder dem Inhibitor **12**, auch das Biotinderivat **21** eingebaut wurde. Das zusätzlich eingebaute Biotinderivat sollte zum einen eine Neutralisierung der gerinnungshemmenden Wirkung der Liposomen mittels Avidin ermöglichen und zum anderen auch

eine komfortable Möglichkeit bieten, um die Liposomen an Oberflächen für SPR-Messungen zu binden. Die präparierten bifunktionalisierten Lipidformulierungen der Zusammensetzungen DPPC/CH/**10/21** und DPPC/CH/**12/21** besitzen marginal reduzierte Thrombinhemmwirkungen im Vergleich zu den analogen monofunktionalisierten Liposomen ohne Biotinderivat. Auch bei den bifunktionalisierten Liposomen wurde eine stärkere Wirksamkeit festgestellt, wenn diese mit dem längeren Inhibitor **10** – anstelle des Inhibitors **12** ohne Spacer – modifiziert wurden.

Die Avidin-basierten Neutralisationsstudien wurden sowohl mit den freien biotinylierten Referenzinhibitoren **11** und **19** als auch mit den bifunktionalisierten Liposomen durchgeführt. Für die freien Inhibitoren **11** und **19** wurde eine stärkere Neutralisierung der gerinnungshemmenden Wirkung durch Avidin ermittelt (Erhöhung der Thrombinrestaktivität von 10 % auf ca. 60-70 %). Demgegenüber zeigte die Zugabe von Avidin zu den DPPC/CH/**10/21**-Liposomen nur einen marginalen Effekt, die Thrombinhemmwirkung ließ sich nur geringfügig reduzieren. Auch die Erhöhung der Konzentration der biotinylierten Verbindung **21** – von 10 Mol % auf 100 Mol %, bezogen auf den Inhibitor **10** – führte nur zu einer leicht stärkeren Abschwächung der Thrombinhemmung durch Avidin. Möglicherweise wäre im Hinblick auf eine bessere Antidotwirkung ein noch längerer Spacer zwischen dem Biotin und dem Fettsäurerest erforderlich. Eventuell war der eingesetzte Tota-Spacer (Verbindung **21**, Kettenlänge von 15 Atomen) zu kurz.

Die Inhibitoren **9**, **17**, **28** und **44** mit terminaler Aminogruppe können für eine kovalente Oberflächenmodifizierung genutzt werden, um gerinnungshemmende Materialeigenschaften zu generieren. Als „proof of principle“ wurde der Inhibitor **9** kovalent mit einem Glaträger verknüpft, und die Thrombinhemmwirkung dieses Trägers wurde in einem enzymkinetischen Ansatz untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse demonstrieren, dass das beschichtete Glas thrombinhemmende Eigenschaften besitzt und daher auch zur Gerinnungshemmung dienen kann. Daher könnten solche Inhibitoren mit terminaler Aminogruppe für eine kovalente gerinnungshemmende Modifizierung von artifiziellen Oberflächen, wie etwa von künstlichen Herzklappen oder von Dialysatormembranen, geeignet sein.

Zusammenfassend ist hier festzuhalten, dass es im Rahmen dieser Dissertation gelungen ist, hochwirksame Thrombininhibitoren mit Palmitinsäure-, Biotin- und bifunktionellen Ethylenglykol-Resten zu modifizieren, wobei die Hemmwirkung nahezu erhalten blieb.

Die freien biotinylierten Inhibitoren eignen sich zur Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, beispielsweise mittels SPR-Messungen. Außerdem wurde unter Verwendung der palmitoylierten Thrombininhibitoren eine komfortable und effiziente nicht-kovalente Konjugationsmethode in Liposomenform entwickelt. Die erhaltenen Liposomen besitzen starke gerinnungshemmende Eigenschaften; durch den Einbau der palmitoylierten Inhibitoren in die DPPC/CH-Liposomen blieb die Hemmwirkung der Inhibitoren weitestgehend erhalten. Obwohl die Wirkung dieser Konjugate *in vivo* noch nicht gezeigt werden konnte, ist anzunehmen, dass der Konjugationsprozess eine verlängerte Verweildauer der Inhibitoren in der Zirkulation zur Folge haben dürfte. Die Stabilität der in dieser Arbeit verwendeten konventionellen DPPC/CH-Liposomen im Blut sollte sich durch Zusatz geringer Mengen an PL-PEG-Konjugaten, wie beispielsweise 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanol-amine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000], noch weiter erhöhen lassen. Es ist allgemein bekannt, dass Lipidformulierungen, die pegylierte Phospholipide als Membrankomponenten enthalten, vor rascher Opsonierung und vor einer damit verbundenen Phagozytose deutlich geschützt sind. Mit stabileren Liposomen und unter Einsatz längerer Spacer zwischen dem Biotin und dem Fettsäurerest könnte möglicherweise auch die Neutralisierung der Thrombinhemmwirkung der bifunktionellen Liposomen mittels Avidin optimiert werden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden, insbesondere die Multimerisierung, lassen sich auch auf andere Wirkstoffe übertragen. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass sich die betreffenden Wirkstoffe ohne Aktivitätsverluste über einen geeigneten flexiblen Spacer mit Fettsäureresten modifizieren lassen. Durch die infolge der Multimerisierung erzielte Vergrößerung des Molekulargewichtes der Wirkstoffe lässt sich die jeweilige renale Eliminierungsgeschwindigkeit wesentlich reduzieren. Folglich müssen diese Wirkstoffe weniger häufig verabreicht werden, um den erforderlichen Wirkstoffspiegel am Wirkort zu gewährleisten. Hierdurch ergeben sich in der Praxis relevante Vorteile wie geringere Toxizität sowie effizientere Kosten-Nutzen-Relationen.

7 Experimenteller Teil

7.1 Materialien und Methoden

7.1.1 Verwendete Materialien

Die verwendeten Lösungsmittel wurden kommerziell in der Reinheit p.a. (*per analysi*) oder HPLC-grade von den Firmen Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Roth, Bachem oder Merck erworben oder nach den üblichen Standardverfahren gereinigt. Trockene Lösungsmittel wurden durch Lagerung über geeignetem Molsieb oder im Falle von THF durch Lagerung und Destillation über Natrium erhalten. Für die analytische und präparative HPLC wurde Acetonitril der Firma VWR (HiPerSolv CHROMANORM) sowie Reinstwasser eingesetzt. Wässrige Lösungen von Säuren, Basen oder Salzen wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Zur Herstellung von Reinstwasser wurde eine Anlage NOWApure select der Firma KSN Wassertechnik (Nistertal, Deutschland) verwendet. Standardchemikalien und Aminosäurederivate sowie Kopplungsreagenzien wurden von den Firmen Acros, Sigma-Aldrich, Fluka, VWR, Orpegen Calbiochem, Alfa Aesar, Iris Biotech und Roth bezogen. Die als Spacer eingesetzten Verbindungen 1-(Boc-amino)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamin (Boc-Tota-H) und 8-(Cbz-amino)-3,6-dioxa-octanoic acid (Cbz-Adoa-OH \times DCHA) wurden von der Firma Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Deutschland) gekauft. Als Katalysator für Hydrierungsreaktionen wurde 10 % Pd auf Aktivkohle verwendet. Das für die Dünnschichtchromatographie der Biotinderivate eingesetzte Anfärbereagenz *p*-Dimethylaminozimtaldehyd wurde kommerziell von Sigma-Aldrich bezogen.

7.1.2 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) mit Fluoreszenzindikator (Kieselgel 60, F₂₅₄, Trägermaterial: Aluminiumfolie) verwendet. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus DCM und MeOH. Für die Anfärbung der biotinylierten Verbindungen wurde 2%-ige (w/v) *p*-Dimethylaminozimtaldehyd in schwefelsaurer Ethanollösung (2 % konz. H₂SO₄ in EtOH) eingesetzt. Nach beendeter DC-Trennung wurde das Produkt durch Sprühen und anschließendem Erhitzen als gelber Spot detektiert. Die intensive Gelbfärbung mit Absorptionsmaximum bei 533 nm

wird durch eine Reaktion zwischen den sterisch wenig gehinderten N-1 des Biotins und dem *p*-Dimethylaminozimtaldehyds in Gegenwart von Schwefelsäure hervorgerufen [187, 188]. Die Verbindungen mit aromatischen Gruppen wurden durch UV-Absorption mit einer Desaga HP-UVIS (Desaga GmbH, Wiesloch, Deutschland) bei $\lambda = 254$ nm detektiert.

7.1.3 Präparative Säulenchromatographie

Als Säulenmaterial für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (230-400 mesh ASTM) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Die verwendeten Lösungsmittelgemische sind bei den entsprechenden Synthesen angegeben.

7.1.4 HPLC und Lyophilisierung

Als Eluent diente ein Laufmittelgemisch aus H₂O (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B) mit jeweils 0,1 % (v/v) TFA. Die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 220 und 254 nm. Die Flussraten betrugen 1 mL/min (analytisch) und 20 mL/min (präparativ). Zur Charakterisierung der Verbindungen wurde die Acetonitrilkonzentration, bei der die betreffende Verbindung eluierte, als % B angegeben.

Analytische HPLC

Für die Reaktionskontrolle und zur Charakterisierung von Zwischen- und Endprodukten wurden analytischen HPLC-Messungen auf einer Anlage LC-10A der Firma Shimadzu durchgeführt. Die Anlage bestand aus den Teilsystemen CTO-10A Säulenofen, DGU-14A Degaser, SIL-10Axl Autoinjektor, 2 × LC-10ATvP-Pumpen, SCL-10AvP System Controller und einem SPD-M10AvP Dioden-Array-Detektor. Für die Analysen wurde eine analytische HPLC-Säule (Nucleodur C₁₈, 5 µm, 100 Å, 4,6 × 250 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany) verwendet. Die Trennungen erfolgten mit einem linearen Gradienten, bei dem die Konzentration des Fließmittels B um 1 % je Minute erhöht wurde. Entsprechend der Hydrophobizität der Verbindungen wurden verschiedene Startbedingungen gewählt.

Präparative HPLC

Die Reinigung der Endverbindungen und einiger Intermediate erfolgte mittels einer Varian-HPLC-Anlage, bestehend aus zwei Varian-PrepStar-Pumpen (Modell 218), einem ProStar-Detektor (Modell 320), und einem Varian-Fraktionskollektor (Modell 701).

Es wurden folgende Säulen mit den Abmessungen 32 x 250 mm verwendet:

- Nucleodur 100-5 C8ec, 100 Å, der Firma Macherey-Nagel
- Nucleosil 300-5 C18, 300 Å, der Firma Macherey-Nagel

Alle präparativen HPLC-Läufe erfolgten mit einem lineareren Gradienten (Zunahme des Fließmittels B um ~ 0,5 % je Minute). Die jeweiligen Startbedingungen wurden an die Hydrophobizität der Verbindungen angepasst. Bis auf das Biotinderivat **10** wurden alle finalen Verbindungen als TFA-Salze erhalten.

7.1.5 Lyophilisierung

Zur Gefriertrocknung wurden die synthetisierten Verbindungen in ca. 80 %igem *tert*-BuOH in Reinstwasser oder in Reinstwasser gelöst, eingefroren und mit einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LDplus (Christ, Osterode am Harz) lyophilisiert.

7.1.6 NMR-Spektroskopie

Die ^1H - und ^{13}C -Spektren wurden an einem Jeol-ECX-400 bei 400 bzw. 100 MHz oder mit einem Jeol-ECX500 bei 500 bzw. 126 MHz (Jeol Inc., Peabody, MA) aufgenommen; die chemische Verschiebung wurde in ppm angegeben. Die entsprechenden Spektren sind im Anhang gezeigt.

7.1.7 Massenspektrometrie

Die Massenspektren der synthetisierten Verbindungen wurden an einem QTrap 2000 ESI Massenspektrometer (Applied Biosystems, USA) aufgenommen.

7.2 Enzymkinetische Messungen

Allgemeines

Zur Ermittlung der Hemmkonstanten wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet.

- **Inhibitor-Stammlösungen:** Alle Stammlösungen wurden in DMSO hergestellt.
- **Enzymlagerpuffer (A):** 0,025 M Natrium-Phosphat pH 6.5, mit 500 mg HSA/BSA je Liter.
- **Enzymverdünnungspuffer (B):** 0,9-%ige NaCl-Lösung, die 0,1 % HSA oder BSA enthält.
- **Messpuffer (C):** Tris-Puffer (50 mM Tris·HCl, 154 mM NaCl, pH 8,0).

Die verwendeten trypsinartigen Serinproteasen und ihre Substrate sind in **Tabelle 8** aufgeführt. Die Konzentrationen im Messansatz sind in Klammern angegeben. Als Fluoreszenzsubstrate wurden Tripeptidanaloga mit dem Fluorophor 7-Amino-4-methylcoumarin eingesetzt, die im Arbeitskreis synthetisiert wurden. Die Herstellung der Substratstammlösungen erfolgte in Reinstwasser. Bei Löslichkeitsproblemen in reinem Wasser wurde das Substrat in möglichst wenig DMSO gelöst und mit Wasser auf das gewünschte Volumen verdünnt. Von den Inhibitoren wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mM oder 100 mM in DMSO hergestellt und mit Messpuffer (C) auf die gewünschte Konzentration weiterverdünnt. Für die Berechnung der Molekulargewichte wurde pro basische Gruppe ein Molekül TFA addiert.

Tabelle 8. Verwendete Enzyme und Substrate.

Enzymkonzentration ^[a]	Substratkonzentration ^[a]
α -Thrombin vom Rind ^[b] , 1425 IE/mg 81 pM (11,6 pM)	Tos-Gly-Pro-Arg-AMC, $K_M = 4 \mu\text{M}$ 70 μM (10 μM) 35 μM (5 μM) 17,5 μM (2,5 μM)
humaner Faktor Xa (FXa), 200,35 IE/mg Enzyme Research South Bend, IN USA 0,68 nM (100 pM)	Mes-D-Arg-Pro-Arg-AMC, $K_M = 22 \mu\text{M}$ 350 μM (50 μM) 170 μM (25 μM) 87,5 μM (12,5 μM)
humane Urokinase (uPA), 500,000 IE/Flasche HS medac (Wedel, Deutschland) 11,8 nM (1,68 nM)	Tos-Gly-Pro-Arg-AMC, $K_M = 41 \mu\text{M}$ 1 mM (142,85 μM) 0,5 mM (71,42 μM) 0,25 mM (35,71 μM)
humanes Plasmin, 29,78 U/mg Calbiochem (Darmstadt, Deutschland) 2,47 nM (ca. 350 pM)	Mes-D-Ser(Bzl)-Phe-Arg-AMC, $K_M = 25 \mu\text{M}$ 0,35 mM (50 μM) 0,175 mM (25 μM) 0,0875 mM (12,5 μM)

^[a] Die Konzentrationen im Messansatz sind in Klammern angegeben. ^[b] von Walsmann hergestellt [189].

Bestimmung der Hemmkonstanten mit AMC-Substraten

Die Bestimmung der Hemmkonstanten wurde in FluoroNunc F96 MaxiSorp-Platten (Nunc, Langenselbold, Deutschland) an einem Fluoreszenzplattenleser (Fluoroskan Ascent™, Thermo Fisher Scientific Inc.) durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$. Alle Messungen wurden bei 25 °C in Tris-Puffer (C) mit einem Gesamtvolumen von 140 μL vorgenommen. Es wurden jeweils 100 μL Inhibitorlösung in Tris-Puffer und 20 μL Substratlösung gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 20 μL Enzymlösung gestartet. Der Messansatz ist in **Tabelle 9** wiedergegeben. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von zehn Minuten. Auf jeder Mikrotiterplatte wurde neben den Inhibierungsmessungen auch die Aktivität des Enzyms in Abwesenheit des Inhibitors mit drei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bestimmt. Die K_i -Werte wurden jeweils mit zwei verschiedenen Substrat- und vier unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen ermittelt. Die Hemmkonstanten wurden aus den ermittelten *Steady-state*-Geschwindigkeiten nach der Methode von Dixon [190] bestimmt. Die errechneten K_i -Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei Einzelbestimmungen.

Tabelle 9. Messansatz zur Bestimmung der Hemmkonstanten mit AMC-Substraten.

Volumen (μL)	Reagenzien
100	Inhibitor in Messpuffer gelöst
20	Substrat in H ₂ O gelöst
20	Enzym in Enzymverdünnungspuffer gelöst
140	Gesamtvolumen

7.3 Bestimmung der IC₅₀-Werte

Die IC₅₀-Werte der Thrombin- oder FXa-hemmwirkung der Liposomen wurden jeweils mit den Substraten Tos-Gly-Pro-Arg-AMC (11 μM im Ansatz) und Mes-D-Arg-Pro-Arg-AMC (50 μM in Ansatz) mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bestimmt. Die erhaltenen *Steady-state*-Geschwindigkeiten wurden an **Gleichung 1** angepasst [191].

Gleichung 1: Gleichung zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes (v : Geschwindigkeit der Enzymreaktion in Gegenwart des Inhibitors, v_0 : Geschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion, I : Inhibitorkonzentration, IC₅₀: Inhibitorkonzentration, die eine 50 %ige Hemmung bewirkt, s : Steigungsfaktor. Die Konzentrationen auf der X-Achse beziehen sich auf die für die Liposomenherstellung verwendete Gesamtinhibitorkonzentrationen unter der Annahme eines vollständigen Einbaus in den Liposomen und gleichmäßiger Verteilung auf einzelnen Liposomen.

$$\text{Gleichung 1} \quad v = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{I}{IC_{50}}\right)^s}$$

7.4 Gerinnungsmessungen in Plasma

Verwendete Reagenzien und Lösungen:

Für den Gerinnungstest wurde Plasma vom Deutschen Roten Kreuz (Frankfurt Niederrad) und ein aPTT-Kit der Firma Diagnostica Stago (C.K. Prest® 2, Cat. Nr. 00598) Düsseldorf, Deutschland) verwendet. Das Testkit bestand aus folgenden Reagenzien:

- **Reagenz 1:** gepufferte Kaolinsuspension (Kaolin 5 mg/mL)
- **Reagenz 2:** lyophilisiertes Cephalin (Phospholipid als Plättchenersatz)

Die aPTT-Gerinnungsmessungen wurden in einem Thrombotrack 8 (Immuno GmbH, Heidelberg, Germany) mit folgenden Reagenzien durchgeführt:

- **Reagenz 3:** Mischung aus Reagenz 1 und 2 (1:1, v/v)
- **Tris-Puffer (D):** 50 mM Tris·HCl, pH 7,8, mit 0,1 M NaCl
- **Start-Lösung:** 0,02 M CaCl₂-Lösung
- **Plasma:** (vorinkubiert auf 37 °C)

100 µL Plasma, 100 µL **Reagenz 3** und 80 µL Inhibitor in Tris-Puffer (C) wurden auf 37 °C für sechs Minuten inkubiert. Die Gerinnungsmessung wurde durch Zugabe der CaCl₂-Lösung (100 µl, auf 37 °C vorinkubiert) gestartet. Die erhaltenen Gerinnungszeiten wurden als Funktion der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Für die Ermittlung der normalen Gerinnungszeit (~ 25-35 Sekunden) in Abwesenheit des Hemmstoffs wurden 80 µL Tris-Puffer anstelle der Inhibitorlösung verwendet.

7.5 Neutralisierung der Thrombinhemmwirkung durch Avidin

Die Versuche zur Neutralisierung der Thrombinhemmwirkung der freien Inhibitoren und der bifunktionalisierten Liposomen mittels Avidin erfolgten auf einer Mikrotiterplatte analog den K_i-Bestimmungen. Zuerst wurde die Inhibitor- bzw. Liposomenkonzentration ermittelt, die zu einer ca. 90 %igen Thrombinhemmung führt. Diese zuvor bestimmten Konzentrationen wurden in den Messungen mit Avidin eingesetzt. In einen Messansatz wurden 20 µL Substrat (11 µM im Messansatz, Tos-Gly-Pro-Arg-AMC), 50 µL Inhibitorlösung

bzw. Liposomenlösung und 50 μL Avidin pipettiert und die Messung durch Zugabe von 20 μL Thrombin (15 pM im Messansatz) gestartet. Die Avidinkonzentration wurde im Bereich 0,055-3,6 μM im Ansatz variiert. Die bestimmten Restaktivitäten des Thrombins wurden als Funktion der Avidinkonzentration aufgetragen.

7.6 Herstellung der antikoagulant Liposomen

Die Herstellung und physikochemische Charakterisierung der Liposomen wurde im Arbeitskreis von Prof. Udo Bakowsky durchgeführt. Die Lipidformulierungen mit den Inhibitoren **10**, **12**, **37** und **45** wurden nach der sogenannten Filmmethode hergestellt [180, 192]. Hierfür wurden die Komponenten DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin), CH (Cholesterol) und die palmitoylierten Inhibitoren im Verhältnis 65/30/5 Mol-% verwendet. Zunächst wurden von den Lipiden und Inhibitoren Stammlösungen in einer Mischung aus Chloroform/Methanol (2/1, v/v) hergestellt und anschließend in einem Rundkolben gemischt (die Gesamtmenge aller Komponenten betrugen hierbei 10 mg). Anschließend wurde das Lösungsmittel mittels eines Rotationsverdampfers bei 40 °C Badtemperatur entfernt. Der am Kolbenboden zurückbleibende homogene, transparente Lipidfilm wurde mit 1 ml PBS-Puffer (pH 7,4, 0,15 mol/l) hydratisiert und kräftig geschüttelt. Die erhaltenen Liposomendispersionen wurden durch Ultraschallbehandlung bei 55 °C für 2 min auf den gewünschten Größenbereich verkleinert und bei 4 °C aufbewahrt. Auf diese Weise wurden Liposomen erhalten, in deren äußere Membran die Thrombinhemmstoffe eingebaut wurden. Die Herstellung der bifunktionalisierten Liposomen erfolgte analog, wobei hier zusätzlich das Biotinderivat **21** zur Mischung hinzugefügt wurde, die DPPC, CH und den jeweiligen Inhibitor enthielten. Die eingesetzte Konzentration der Verbindung **21** in der Mischung – bezogen auf den Inhibitor **10** oder **12** – betrug 10 %.

Zusätzlich wurden bifunktionalisierte Liposomen mit dem Inhibitor **10** hergestellt, welche die Verbindung **21** in höheren Konzentrationen (20 Mol %, 50 Mol % oder 100 Mol % bezogen auf den Thrombininhibitor enthalten).

7.7 Physikochemische Charakterisierung der Liposomen

7.7.1 Dynamische Lichtstreuung

Die Messung der hydrodynamischen Durchmesser der Liposomenformulierungen wurde an einem Zetasizer Nano ZS Gerät (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 633 nm und einer Temperatur von 25 °C durchgeführt [193]. Hierzu wurde Licht eines HeNe-Lasers (10 mW) in die Probe eingestrahlt und die Intensität des gestreuten Lichtes in einem 173°-Winkel detektiert. Aus den erhaltenen Diffusionskoeffizienten der Teilchen wurden unter Verwendung der Stokes-Einstein-Gleichung die Partikelgrößen berechnet. Die Messungen wurden jeweils an mindestens drei unabhängigen Proben durchgeführt und das Ergebnis als Mittelwert \pm Standardabweichung der Volumenauswertung angegeben. Für jede Probe wurde dabei der Mittelwert aus mindestens zehn Messungen berechnet.

7.7.2 Laser-Doppler-Anemometrie (LDA)

Die Bestimmung des Zetapotentials der Proben erfolgte ebenfalls an einem Zetasizer Nano ZS Gerät (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland). Dabei wurde unter Anwendung des Messprinzips der Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) zuerst die elektrophoretische Beweglichkeit der Formulierungen bestimmt. Die elektrophoretische Beweglichkeit wurde durch Detektion des eingestrahlt Laserlichtes bei 25 °C und einem Streuwinkel von 17° erhalten und mit Hilfe der Henry-Gleichung in das Zetapotential umgerechnet. Für jede Probe wurde dabei der Mittelwert aus drei Messungen (mit jeweils mindestens zehn Messungen) berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung in **Tabelle 6** angegeben.

7.7.3 Raster-Kraft-Mikroskopie

Für die Raster-Kraft-mikroskopischen Bilder wurden 20 µl der jeweiligen Lipidformulierungen auf Silicium-Chips überführt und getrocknet. Die Messungen erfolgten an einem Nanoscope IV Bioscope (Veeco Instruments, Mannheim, Deutschland) unter Verwendung von kommerziell erhältlichen pyramidalen Si₃N₄-Spitzen (NSC16 AIBS, Mikromasch, Tallin, Estland) mit einem Cantilever von 230 µm Länge (Resonanzfrequenz 170 kHz, nominale

Kraftkonstante 40 N/m) [194], Die Scans wurden im Tapping Mode durchgeführt, um Beschädigungen der Proben zu verhindern. Die Scanfrequenz lag zwischen 0,5 und 1,5 Hz. Die Amplitudensignale des Cantilevers in Scanrichtung und die Höhsignale (z-Auslenkung) entgegen der Scanrichtung wurden simultan erfasst, um entsprechende AFM-Bilder zu erhalten.

7.8 Beschichtung der Glasplatten und Bestimmung der Thrombin-hemmwirkung

Glasoberflächen sind nach Lagerung an der Luft durch Adsorption von Kohlenwasserstoffen kontaminiert [195], die der Oberflächenmodifizierung hinderlich sein können, indem sie die Zugänglichkeit der für die Silanisierung notwendigen Silanolgruppen beeinträchtigen [196]. Aus diesem Grund wurden die Glasoberflächen vor der Modifikation mit Chloroform gewaschen und mit einem Tuch durch mechanisches Abreiben gesäubert. Im zweiten Reinigungsschritt wurden die Glasplatten zusätzlich mit einer Mischung aus Wasserstoffperoxid und konz. Schwefelsäure (Piranha-Lösung) oxidativ gereinigt [197]. Die Säurebehandlung hat weiterhin den Vorteil, dass vorhandene Alkalimetallionen wie Natriumkationen an der Oberfläche gegen Protonen ausgetauscht werden. Dadurch erhöht sich die Anzahl der für die Modifizierung verfügbaren Silanolgruppen.

Die gereinigten Glaträger wurden in einem Becherglas, das eine 1 mM 3-Aminopropyltrimethoxysilanlösung in trockenem Chloroform enthielt, über Nacht inkubiert. Nach erfolgter Reaktion wurden die Proben gewaschen, um nicht gebundenes Silan zu entfernen. Danach wurden die Glasoberflächen aus der Lösung genommen, mit Chloroform gewaschen und im Trockenschrank bei 105 °C für eine Stunde getrocknet. Die Gläser wurden dann mit einer Cyanurchloridlösung in Chloroform (1 mM) in Gegenwart eines äquimolaren Gehaltes an N,N-Diisopropylethylamin bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Nach einem Spülschritt mit abs. Chloroform wurden die Trägeroberflächen getrocknet. Anschließend wurde Inhibitor 9 in Chloroform gelöst, und die Glasplatten wurden darin inkubiert. Nach beendeter Immobilisierung wurden die Glaträger mit Chloroform gespült getrocknet sowie für die weitere Verwendung trocken aufbewahrt.

Die Thrombinhemmwirkung der mit Verbindung 9 modifizierten Glasplatten wurde an einem Shimadzu Spektrophotometer (RF-5301PC Spectrofluorophotometer) bestimmt.

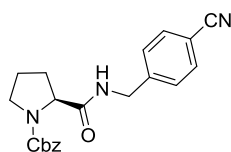
Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ und bei einer Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$. Die beschichteten Glasplatten (5 x 3 cm) wurden mit einem Glasschneider auf das gewünschte Maß zugeschnitten, und die erhaltenen Glasfragmente wurden in einer Standardküvette (Rotilabo®-Einmal-Küvetten, PMMA, 4.5 mL) platziert. Danach wurden 200 μL Substratlösung (Tos-Gly-Pro-Arg-AMC, 11 μM im Ansatz) und 1600 μL **Messpuffer C** pipettiert, und anschließend wurde die Messung durch Zugabe von 400 μL einer Thrombinlösung (Konzentration im Ansatz: 15 pM) gestartet. Als Referenz wurde hierbei unbeschichtetes Glas verwendet. Die erhaltenen Thrombinrestaktivitäten wurden als Funktion der Masse der eingesetzten Glasfragmente aufgetragen (*Abb. 27*).

7.9 Synthese

7.9.1 Synthese des P2-P1-Segments H-Pro-4-Amba \times 2 HCl

H-Pro-4-(Amidino)benzylamin wurde für alle Inhibitoren als P2-P1-Segment verwendet und wurde entsprechend der in der Literatur beschriebenen Syntheseroute hergestellt [151]. Die Synthese wurde mehrfach mit unterschiedlichen Maßstäben wiederholt, die nicht gesondert aufgeführt sind. Bei einigen Intermediaten wurden die Rohprodukte, die teilweise auch noch Salze enthalten haben, nicht gereinigt. In diesen Fällen sind keine prozentualen Ausbeuten angegeben.

1) Cbz-Pro-4-Cyanobenzylamid



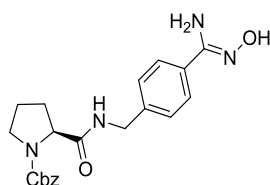
MG: 363,42

12,46 g (50 mmol) Cbz-Pro-OH wurden in 150 mL trockenem THF vorgelegt und mit 5,5 mL (50 mmol) NMM versetzt. Die Lösung wurde auf $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Nach Zugabe von 6,5 mL (50 mmol) Chlorameisensäureisobutylester wurde die Reaktionsmischung unter Kühlung für weitere 10 Minuten gerührt. Anschließend wurde das Mischanhydrid mit 8,43 g (50 mmol) 4-Cyanobenzylamin \times HCl und 5,5 mL (50 mmol) NMM versetzt und die Suspension wurde für 1,5 Stunden bei ca. -15 ° und dann bei RT über Nacht gerührt. Das THF wurde i. V. entfernt und der Rückstand in EtOAc und 5%-iger KHSO_4 -Lösung aufgenommen. Die Mischung wurde dreimal mit 5%-iger KHSO_4 -, dreimal mit gesättigter NaHCO_3 - und einmal mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Öl wurde i. V. getrocknet und ohne weitere Aufreinigung zu Verbindung **2** umgesetzt.

- Ausbeute: 16 g, 44 mmol, 88,1 %, weißer Feststoff.

- HPLC: 39.82 min (Start bei 10 % B).
- ^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D6) δ = 7,54 (s, 2H), 7,41 – 7,14 (m, 8H), 5,15 (s, 2H), 4,55 – 4,31 (m, 3H), 3,64 – 3,37 (m, 2H), 2,50 – 1,81 (m, 4H).

2) Cbz-Pro-(4-Hydroxyamidino)benzylamid

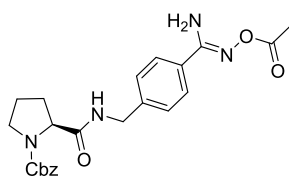


MG: 396,45

Verbindung **1** (8 g, 22,01 mmol) wurde in 30 mL abs. Ethanol vorgelegt und mit jeweils zwei Äquiv. Hydroxylamin \times HCl (44,02 mmol, 3,1 g) und DIPEA (44,02 mmol, 7,5 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt und bei RT über Nacht gerührt. Das ausgefallene weiße Rohprodukt wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

- HPLC: 22.74 min (Start bei 10 % B).

3) Cbz-Pro-4-(Acetylhydroxyamidino)benzylamid

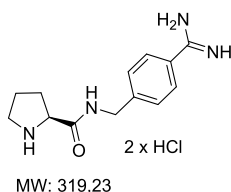


MG: 438,48

Das Hydroxyamidino-Intermediat **2** (8,3 g, 20,9 mmol) wurde in 80 mL AcOH gelöst, mit zwei Äquiv. Acetanhydrid (3,9 mL, 41,8 mmol,) versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. AcOH und überschüssiges Acetanhydrid wurden am Rotationsverdampfer entfernt (Badtemperatur ≤ 35 °C). Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen und mit verdünnter NaCl-Lösung gewaschen. Der ausgefallene weiße Feststoff wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und i. V. getrocknet.

- Ausbeute: 6 g, 13,68 mmol, 65,5 %, weißer Feststoff.
- HPLC: 32.12 min (Start bei 10 % B).

4) H-Pro-4-Amidinobenzylamin (H-Pro-4-Amba) \times 2 HCl



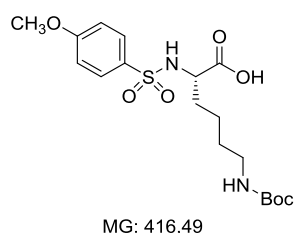
Verbindung **3** (6 g, 13,68 mmol) wurde in 200 mL 90 %-iger AcOH gelöst und mit 0,5 g Pd/C (Palladium auf Aktivkohle) versetzt. Der Ansatz wurde bei Normaldruck unter H₂-Atmosphäre über Nacht gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels HPLC kontrolliert. Nach erfolgtem Umsatz wurde der Katalysator abfiltriert und das Filtrat i. V. eingengt. Der Rückstand wurde mit 100 mL einer 0,5 N HCl-Lösung aufgenommen und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Dann wurde der Rückstand mit Wasser aufgenommen und das Wasser i. V. entfernt. Der letzte Schritt wurde dreimal wiederholt, um überschüssige HCl möglichst vollständig zu beseitigen. Es wurde ein gelbes Öl erhalten, welches aus reinem Wasser lyophilisiert wurde.

- Aubeute: 3,4 g, 10,65 mmol, 77,8 %, leicht bräunlicher Lyophilisat.
- HPLC: 11.36 min (Start bei 1 % B).
- MS: ber. 246,15; gef. 247,11 (M+H)⁺.

7.9.2 Synthese der Inhibitoren mit *L*-Aminosäuren in P3-Position

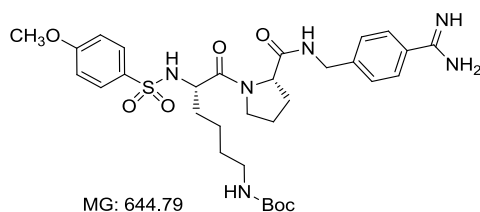
Die Inhibitoren **7** und **15** wurden bereits früher hergestellt und für enzymkinetische Messungen mit Thrombin verwendet [151]. Jedoch wurde deren Synthese in der Literatur noch nicht detailliert beschrieben. In manchen Fällen wurde die Synthese mehrfach mit unterschiedlichen Maßstäben wiederholt, die nicht gesondert aufgeführt sind.

5) 4-MeO-Bs-Lys(Boc)-OH



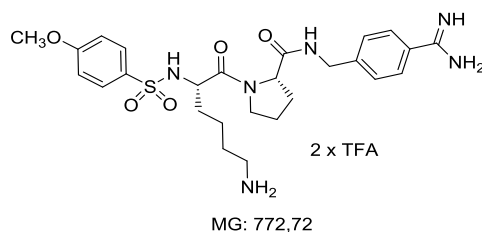
1,0 g (4,06 mmol) H-Lys(Boc)-OH wurden in 50 mL einer ACN/H₂O-Mischung (1/1; v/v) suspendiert und mit 2,5 Äquiv. DIPEA (1,73 mL, 8,12 mmol) versetzt. Anschließend wurden 0,9 g (4,06 mmol) 4-Methoxybenzolsulfonylchlorid, gelöst in ACN (2,5 mL/mmol), unter Eiskühlung portionsweise hinzugefügt. Der Ansatz wurde für weitere 30 Minuten unter Eiskühlung und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in EtOAc und 5%-iger KHSO₄-Lösung aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit 5%-iger KHSO₄-Lösung gewaschen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt.

- Ausbeute: 1,13 g, 2,71 mmol, 66,8 %, weißer Feststoff.
- HPLC: 38,72 min (Start bei 10 % B).

6) 4-MeO-Bs-Lys(Boc)-Pro-4-Amba × TFA

1,0 g (2,4 mmol) Intermediat **5** und 0,8 g (2,4 mmol) H-Pro-4-Amidinobenzylamid × 2 HCl (Intermediat **4**) wurden in 15 mL DMF vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von einem Äquiv. BOP (1,1 g, 2,4 mmol) wurden 2,5 Äquiv. DIPEA (1 mL, 6 mmol) portionsweise hinzugefügt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls durch Zusatz von weiterem DIPEA auf pH 8-9 eingestellt. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel i. V. entfernt. Der Rückstand (braunes Öl) wurde ohne Reinigung im nächsten Schritt verwendet.

- HPLC: 32,94 min (Start bei 10 % B).

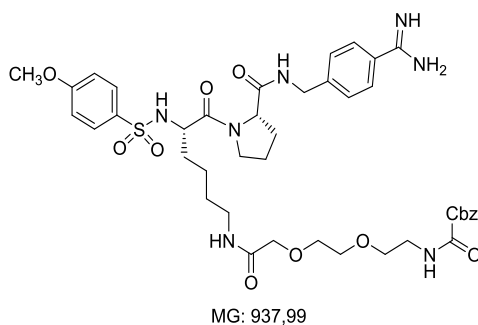
7) 4-MeO-Bs-Lys-Pro-4-Amba × 2 TFA (MI-900)

Das Intermediat **6** wurde mit ca. 5 mL TFA versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionsmischung i. V. eingeeengt, das Produkt mit Diethylether gefällt, mittels präparativer HPLC gereinigt und aus Wasser lyophilisiert.

- Ausbeute: 800 mg, 1,47 mmol, 43, 24 % (über zwei Stufen, Verbindung **6** und **7**), weißes Lyophilisat.

- HPLC: 16,99 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 544,25; gef. 545,21 (M+H)⁺.
- ¹H NMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.27 (m, 4H), 8.44 (t, J=6.1, 1H), 7.82 – 7.65 (m, 8H), 7.41 (d, J=8.4, 2H), 7.07 (d, J=9.0, 2H), 4.35 (dd, J=16.2, 6.1, 1H), 4.28 (dd, J=16.1, 5.9, 1H), 3.94 – 3.86 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.52 – 3.44 (m, 1H), 3.43 – 3.34 (m, 1H), 2.76 – 2.64 (m, 2H), 1.93 – 1.67 (m, 4H), 1.64 – 1.28 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D₆) δ = 171.50, 168.91, 165.47, 162.14, 158.55, 158.29, 145.88, 132.49, 128.69, 128.64, 127.98, 127.09, 126.40, 118.09, 115.72, 113.91, 113.87, 66.88, 59.36, 55.65, 53.32, 46.57, 41.54, 31.20, 29.07, 26.44, 24.25, 21.61.

8) 4-MeO-Bs-Lys(Cbz-Adoa)-Pro-4-Amba



5 g (10,45 mmol) Cbz-Adoa-OH \times DCHA (Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland) wurde in ca. 50 mL EtOAc und 50 mL 5%-iger KHSO₄-Lösung aufgenommen und die wässrige Phase wurde zweimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Der Rückstand wurde i. V. getrocknet, das erhaltene farblose Öl (3 g, 10,1 mmol) wurde bei -20 °C aufbewahrt.

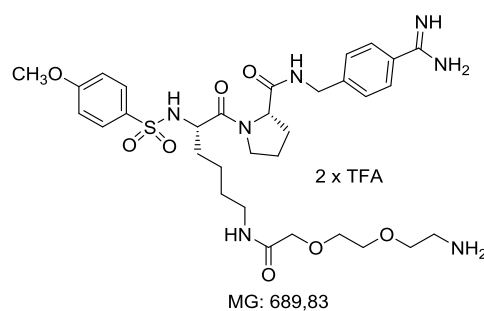
Anschließend wurde Cbz-Adoa-OH an Intermediat **7** gekoppelt. Hierfür wurden 100 mg (0.13 mmol) Verbindung **7** und Cbz-Adoa-OH (39 mg, 0.13 mmol) in 2 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und mit einem Äquiv. BOP (58 mg, 0,13 mmol) versetzt. Im nächsten Schritt wurden 2 Äquiv. DIPEA (44 μ L, 0,26 mmol) portionsweise hinzugefügt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls durch Zusatz von weiterem DIPEA auf pH 8-9 eingestellt. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Das DMF wurde i. V. entfernt und der Rückstand (braunes Öl) wurde ohne Reinigung für den nächsten Schritt eingesetzt. Ein Teil des Rohproduktes wurde

für die NMR-Spektroskopie mittels präparativer HPLC gereinigt und aus 80%-igem tert-BuOH lyophilisiert.

Ausbeute: n.b., braunes Öl.

- HPLC: 33,51 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 823,95; gef. 824,14 (M+H)⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.24 (s, 2H), 9.13 (s, 2H), 8.36 (t, *J*=6.1, 1H), 7.75 – 7.70 (m, 3H), 7.70 – 7.66 (m, 2H), 7.61 (t, *J*=5.8, 1H), 7.41 (d, *J*=8.5, 2H), 7.38 – 7.28 (m, 5H), 7.25 (t, *J*=5.3, 1H), 7.09 – 7.04 (m, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.35 (dd, *J*=16.3, 6.1, 1H), 4.29 (dd, *J*=16.2, 6.0, 1H), 3.94 – 3.79 (m, 7H), 3.55 (s, 4H), 3.51 – 3.45 (m, 1H), 3.45 – 3.36 (m, 3H), 3.16 (q, *J*=5.9, 2H), 2.99 (dd, *J*=13.0, 6.3, 2H), 1.92 – 1.68 (m, 4H), 1.62 – 1.18 (m, 5H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 171.49, 169.21, 168.98, 165.40, 162.10, 158.47, 158.22, 157.97, 156.16, 145.95, 137.15, 132.54, 128.69, 128.29, 127.97, 127.70, 127.66, 127.07, 126.32, 113.90, 70.13, 69.95, 69.92, 69.25, 69.10, 66.88, 65.19, 59.44, 55.63, 53.45, 46.55, 41.53, 37.84, 31.32, 30.62, 28.98, 28.58, 24.28, 22.10.

9) 4-MeO-Bs-Lys(Adoa)-Pro-4-Amba × 2 TFA (MI-901)

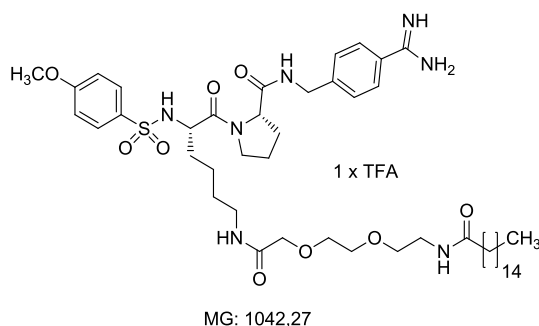


Das gesamte Rohprodukt des Intermediates **8** wurde mit 1 mL einer 32 %-igen Lösung von Bromwasserstoff in AcOH versetzt und bei RT unter gelegentlichem Schütteln 30 Minuten stehen gelassen. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch eingengt, der Rückstand mittels HPLC gereinigt und das Produkt aus 80%-igem tert-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: 66,8 mg, 0,073 mmol, 56 %, (über zwei Stufen, Verbindung **8** und **9**), weißes Lyophilisat.

- HPLC: 18,29 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 689,32; gef. 690,29 (M+H)⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.22 (s, 2H), 9.18 (s, 2H), 8.36 (t, J=6.1, 1H), 7.80 (s, 3H), 7.73 – 7.62 (m, 6H), 7.37 (d, J=8.5, 2H), 7.05 – 7.01 (m, 2H), 4.31 (dd, J=16.3, 6.0, 1H), 4.25 (dd, J=16.3, 6.1, 1H), 3.89 – 3.83 (m, 4H), 3.80 (s, 3H), 3.60 – 3.54 (m, 6H), 3.48 – 3.42 (m, 1H), 3.39 – 3.32 (m, 1H), 3.01 – 2.91 (m, 4H), 1.88 – 1.65 (m, 4H), 1.58 – 1.18 (m, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 171.49, 169.12, 169.00, 165.42, 162.11, 158.39, 158.13, 145.92, 132.50, 128.69, 127.98, 127.07, 126.36, 113.89, 69.94, 69.89, 69.40, 66.88, 55.64, 53.46, 46.54, 41.52, 37.91, 31.35, 29.01, 28.57, 24.27, 22.13.

10) 4-MeO-Bs-Lys(Palmitoyl-Adoa)-Pro-4-Amba × TFA (MI-902)

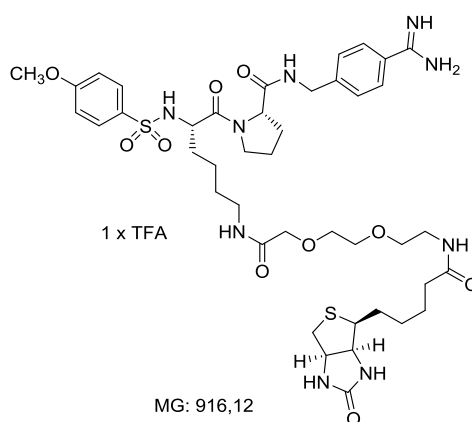


100 mg (0.11 mmol) der Verbindung **9** und 28 mg (0.11 mmol) Palmitinsäure wurden in 2 mL DMF gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit einem Äquiv. BOP (49 mg, 0,11 mmol) versetzt. Nach Zugabe von 2 Äquiv. DIPEA (38 µL, 0,22 mmol) wurde der Ansatz 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus 80%-igem *tert*-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: 75 mg, 0,072 mmol, 65,42 %, weißes Lyophilisat.
- HPLC: 20,88 min (Start bei 50 % B).
- MS: ber. 927,55; gef. 928,63 (M+H)⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.24 (s, 2H), 9.08 (s, 2H), 8.35 (t, J=6.1, 1H), 7.78 (t, J=5.6, 1H), 7.75 – 7.65 (m, 5H), 7.62 (t, J=5.9, 1H), 7.41 (d, J=8.4, 2H), 7.06 (d, J=9.0, 2H), 4.35 (dd, J=16.3, 6.1, 1H), 4.29 (dd, J=16.2, 6.1, 1H),

3.94 – 3.80 (m, 7H), 3.58 – 3.46 (m, 5H), 3.40 (t, $J=6.0$, 3H), 3.22 – 3.15 (m, 2H), 3.00 (dd, $J=13.0$, 6.4, 2H), 2.04 (t, $J=7.5$, 2H), 1.93 – 1.68 (m, 4H), 1.61 – 1.16 (m, 32H), 0.85 (t, $J=6.9$, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- D_6) δ = 172.23, 171.48, 169.20, 168.96, 165.36, 162.10, 158.40, 158.13, 145.95, 132.54, 128.68, 127.97, 127.06, 126.30, 113.88, 70.13, 69.95, 69.27, 69.11, 59.44, 55.62, 53.46, 46.55, 41.53, 38.36, 37.84, 35.28, 31.22, 28.98, 28.96, 28.95, 28.93, 28.87, 28.73, 28.63, 28.60, 25.20, 24.28, 22.10, 22.02, 13.87.

11) 4-MeO-Bs-Lys(Biotinyl-Adoa)-Pro-4-Amba \times TFA (MI-903)

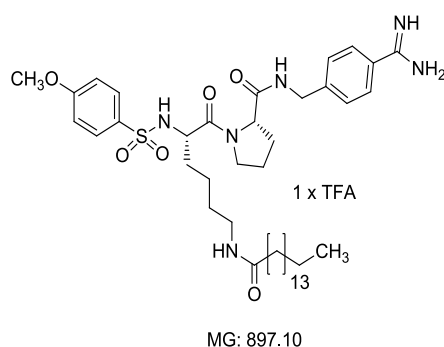


100 mg (0.11 mmol) der Verbindung **9** und 28 mg (0.11 mmol) Biotin wurden in 2 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und mit einem Äquiv. BOP (49 mg, 0,11 mmol) versetzt. Nach Zugabe von 2 Äquiv. DIPEA (37 μL , 0,22 mmol) wurde der Ansatz 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Anschließend wurde das DMF i. V. entfernt, der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert.

- Ausbeute: 68 mg, 0,07 mmol, 66 %, weißes Lyophilisat.
- HPLC: 24,52 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 915,40; gef. 916,47 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.
- ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) δ = 9.24 (s, 2H), 9.01 (s, 2H), 8.35 (t, $J=6.0$, 1H), 7.80 (t, $J=5.6$, 1H), 7.75 – 7.65 (m, 5H), 7.62 (t, $J=5.9$, 1H), 7.41 (d, $J=8.4$, 2H), 7.10 – 7.02 (m, 2H), 6.44 – 6.26 (m, 2H), 4.36 – 4.28 (m, 2H), 4.12 (dd, $J=7.7$, 4.5, 1H), 3.93 – 3.81 (m, 7H), 3.57 – 3.46 (m, 6H), 3.43 – 3.37 (m, 3H), 3.21 – 3.07 (m, 3H), 3.00 (dd, $J=13.4$, 6.7, 2H), 2.82 (dd, $J=12.5$, 5.1, 1H), 2.60 – 2.56 (m, 1H), 2.07 (t, $J=7.4$, 2H), 1.90 – 1.24 (m, 16H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- D_6) δ = 172.14, 171.48, 169.20,

168.98, 165.33, 162.65, 162.10, 158.20, 157.94, 145.95, 132.52, 128.68, 127.98, 127.06, 126.29, 113.89, 70.12, 69.95, 69.27, 69.10, 61.00, 59.17, 55.63, 55.35, 53.56, 53.45, 46.56, 41.79, 41.54, 38.37, 37.84, 36.39, 35.06, 31.30, 28.98, 28.58, 28.13, 27.98, 25.20, 24.28, 22.10.

12) 4-MeO-Bs-Lys(Palmitoyl)-Pro-4-Amba × TFA (MI-906)

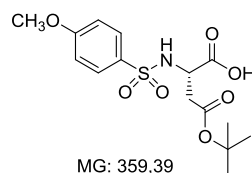


100 mg (0.13 mmol) der Verbindung **7** und 34 mg (0.13 mmol) Palmitinsäure wurden in 2 mL DMF gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit einem Äquiv. BOP (58 mg, 0.13 mmol) versetzt. Nach Zugabe von 2 Äquiv. DIPEA (44 µL, 0.26 mmol) wurde der Ansatz 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, der Rückstand mittels HPLC gereinigt und das Produkt aus 80%-igem *tert*-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: 92 mg, 0.10 mmol, 78.6 %, weißes Lyophilisat.
- HPLC: 22,58 min (Start bei 50 % B).
- MS: ber. 782,48; gef. 783,45 (M+H)⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.25 (s, 2H), 9.20 – 9.11 (m, 2H), 8.38 (t, *J*=6.1, 1H), 7.76 – 7.63 (m, 6H), 7.41 (d, *J*=8.4, 2H), 7.10 – 7.04 (m, 2H), 4.35 (dd, *J*=16.3, 6.0, 1H), 4.29 (dd, *J*=16.2, 6.1, 1H), 3.93 (dd, *J*=7.7, 3.8, 1H), 3.88 (td, *J*=8.5, 5.7, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.52 – 3.36 (m, 2H), 2.91 (dd, *J*=12.4, 6.4, 2H), 2.00 (t, *J*=7.4, 2H), 1.94 – 1.67 (m, 4H), 1.64 – 1.33 (m, 4H), 1.33 – 1.09 (m, 28H), 0.85 (t, *J*=6.9, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 171.93, 171.52, 169.18, 165.37, 162.09, 158.48, 158.24, 145.92, 132.56, 128.66, 127.95, 127.06, 126.30, 113.88, 59.43, 55.62, 53.44,

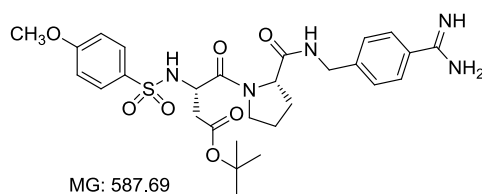
46.56, 41.55, 35.35, 31.34, 31.22, 28.98, 28.87, 28.72, 28.63, 28.54, 25.23, 24.28, 22.07, 22.02, 13.86.

13) 4-MeO-Bs-Asp(OtBu)-OH



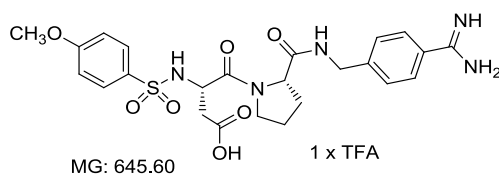
1,0 g (5,28 mmol) H-Asp-(OtBu)-OH wurden in 50 mL einer ACN/H₂O-Mischung (1/1; v/v) suspendiert und mit 2,5 Äquiv. DIPEA (2,3 mL, 10,56 mmol) versetzt. Anschließend wurden 1,2 g (5,56 mmol) 4-Methoxybenzolsulfonylchlorid, gelöst in ACN (2,5 mL/mmol), unter Eiskühlung portionsweise hinzugefügt. Der Ansatz wurde für weitere 30 Minuten unter Eiskühlung und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und der Rückstand in EtOAc und 5%-iger KHSO₄-Lösung aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 5%-iger KHSO₄-Lösung gewaschen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt.

- Ausbeute: 1,54 g, 4,3 mmol, 77,3%, weißer Feststoff.
- HPLC: 37,56 min (Start bei 10 % B).

14) 4-MeO-Bs-Asp(OtBu)-Pro-4-Amba

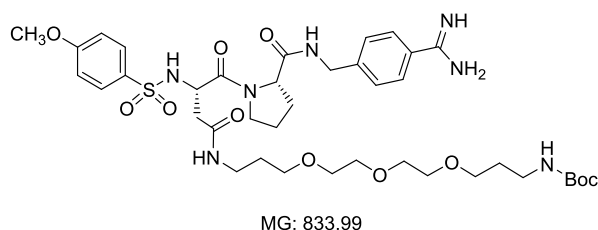
0,50 g (1,39 mmol) Intermediat **13** und 0,44 g (1,39 mmol) H-Pro-4-Amidinobenzylamid $\times 2$ HCl wurden in 10 mL DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von einem Äquiv. BOP (0,61 g, 1,39 mmol) wurden 2,5 Äquiv. DIPEA (0,6 mL, 3,48 mmol) portionsweise hinzugefügt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls durch Zusatz von weiterem DIPEA auf pH 8-9 eingestellt. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. V. entfernt und der ölige Rückstand wurde ohne Reinigung für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

- Ausbeute: n.b. (das Rohprodukt mit Verunreinigung).
- HPLC: 31,50 min (Start bei 10 % B).

15) 4-MeO-Bs-Asp-Pro-4-Amba × TFA (MI-0013)

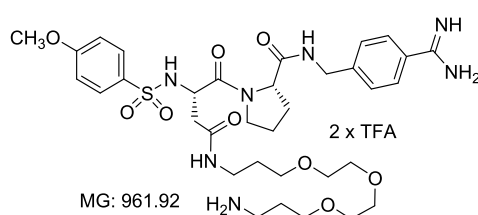
Das Intermediat **14** wurde mit ca. 5 mL TFA versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde i. V. eingengt, das Rohprodukt mit Diethylether gefällt, mittels präoperativer HPLC gereinigt und aus Wasser lyophilisiert.

- Ausbeute: 345 mg, 0,53 mmol, 38.5 % (über zwei Stufen, Verbindungen **14** und **15**), weißes Lyophilisat.
- HPLC: 20,37 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 531,18; gef. 532,14 (M+H)⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 12.55 (s, 1H), 9.31 – 9.08 (m, 4H), 8.11 (d, *J*=9.2, 1H), 8.06 (t, *J*=6.2, 1H), 7.75 – 7.66 (m, 4H), 7.38 (d, *J*=8.5, 2H), 7.13 – 7.02 (m, 2H), 4.40 – 4.22 (m, 3H), 3.87 – 3.81 (m, 4H), 3.67 – 3.59 (m, 1H), 3.51 – 3.45 (m, 1H), 2.73 (dd, *J*=16.6, 6.9, 1H), 2.32 (dd, *J*=16.6, 7.0, 1H), 1.92 – 1.69 (m, 4H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 171.69, 171.17, 168.36, 165.44, 162.20, 158.53, 158.28, 145.83, 132.60, 128.68, 128.62, 127.98, 126.96, 126.33, 114.03, 114.01, 66.89, 59.92, 55.66, 55.55, 52.27, 50.40, 46.52, 41.59, 31.26, 28.97, 23.99.

16) 4-MeO-Bs-Asp(Boc-Tota)-Pro-4-Amba

100 mg (0,16 mmol) der Verbindung **15** und Boc-Tota-H (50 mg, 0,16 mmol) wurden in 2 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und mit einem Äquiv. BOP (69 mg, 0,16 mmol) versetzt. Anschließend wurden 2 Äquiv. DIPEA (53 µL, 3,2 mmol) portionsweise hinzugefügt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls durch Zusatz von weiterem DIPEA auf pH 8-9 eingestellt. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und das Rohprodukt (braunes Öl) wurde ohne Reinigung für den nächsten Schritt eingesetzt.

- Ausbeute: n.b., Rohprodukt mit Salzen als braunes Öl.
- HPLC: 33,32 min (Start bei 10 % B).

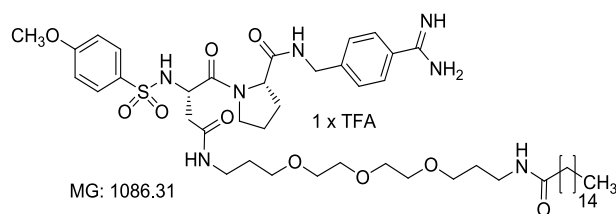
17) 4-MeO-Bs-Asp(Tota)-Pro-4-Amba × 2 TFA (MI-904)

Das Boc-geschützte Rohprodukt **16** wurde mit 1 mL TFA versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde i. V. eingengt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt und aus Wasser lyophilisiert.

- Ausbeute: 60 mg, 62,4 µmol, 42 % (über zwei Stufen, Verbindung **16** und **17**), weißes Lyophilisat.
- HPLC: 19,62 min (Start bei 10 % B).

- MS: ber. 733,35; gef. 734,37 ($M+H$)⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.30 (s, 2H), 9.20 (s, 2H), 8.17 (t, J=6.2, 1H), 8.09 (d, J=9.2, 1H), 8.03 (t, J=5.5, 1H), 7.83 – 7.63 (m, 7H), 7.34 (d, J=8.5, 2H), 7.06 (d, J=9.0, 1H), 4.33 – 4.18 (m, 3H), 3.85 – 3.78 (m, 4H), 3.59 (dd, J=11.9, 5.5, 1H), 3.51 – 3.35 (m, 13H), 3.26 – 3.20 (m, 2H), 2.92 – 2.73 (m, 4H), 2.62 (dd, J=15.4, 9.4, 1H), 2.32 (dd, J=15.5, 5.3, 1H), 1.83 – 1.69 (m, 4H), 1.41 (quin, J=6.9, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 171.06, 169.40, 168.97, 165.43, 162.18, 158.52, 158.28, 145.83, 132.64, 128.56, 127.87, 126.93, 126.26, 118.32, 115.94, 113.99, 69.64, 69.58, 69.41, 69.39, 67.82, 67.29, 59.94, 55.68, 50.22, 46.35, 41.63, 36.72, 35.72, 28.95, 28.82, 27.13, 23.68.

18) 4-MeO-Bs-Asp(Palmitoyl-Tota)-Pro-4-Amba × TFA (MI-909)

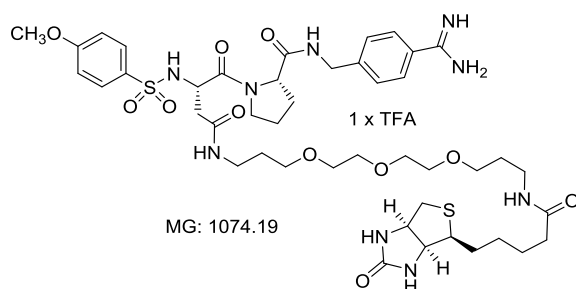


50 mg (52 μ mol) der Verbindung **17** und 13,3 mg (52 μ mol) Palmitinsäure wurden in 2 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und mit einem Äquiv. BOP (23 mg, 52 μ mol) versetzt. Nach Zugabe von 2 Äquiv. DIPEA (18 μ L, 104 μ mol) wurde der Ansatz 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus 80%-igem *tert*-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: 30 mg, 46 μ mol, 53 %, weißes Lyophilisat.
- HPLC: 21,38 min (Start bei 50 % B).
- MS: ber. 971,58; gef. 972,41 ($M+H$)⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.28 – 9.16 (m, 2H), 9.07 (s, 2H), 8.16 (t, J=6.2, 1H), 8.10 (d, J=9.1, 1H), 8.07 – 7.99 (m, 1H), 7.79 – 7.63 (m, 5H), 7.45 (d, J=8.4, 1H), 7.34 (d, J=8.4, 1H), 7.09 – 6.98 (m, 2H), 4.36 – 4.21 (m, 2H), 3.85 – 3.77 (m, 3H), 3.59 (dd, J=14.6, 8.1, 1H), 3.49 – 3.19 (m, 14H), 3.05 – 2.73 (m, 4H), 2.64 (dd, J=15.5, 9.8, 1H), 2.32 (dd, J=15.5, 5.0, 1H), 2.04 – 1.65 (m, 5H), 1.61 – 1.36 (m, 6H),

1.20 (s, 24H), 0.82 (t, J=6.9, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 171.96, 171.03, 169.44, 169.00, 165.31, 162.18, 158.36, 158.12, 145.87, 132.67, 128.54, 128.06, 127.87, 127.19, 126.91, 126.19, 114.31, 113.99, 69.70, 69.47, 69.39, 68.07, 67.78, 59.98, 55.67, 50.17, 46.35, 41.67, 35.63, 35.34, 31.22, 29.37, 29.15, 28.95, 28.70, 28.61, 25.22, 23.61, 22.01, 13.86.

19) 4-MeO-Bs-Asp(Biotinyl-Tota)-Pro-4-Amba \times TFA (MI-905)

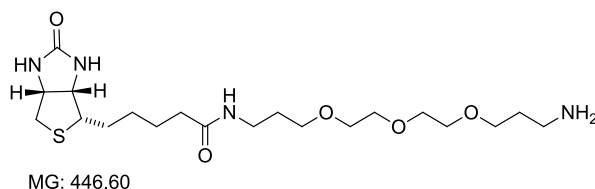


100 mg (0.1 mmol) der Verbindung **17** und 25 mg (0.1 mmol) Biotin wurden in 2 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und mit einem Äquiv. BOP (44 mg, 0,1 mmol) versetzt. Nach Zugabe von 2 Äquiv. DIPEA (34 μL , 0,2 mmol) wurde der Ansatz 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt und aus Wasser lyophilisiert.

- Ausbeute: 68 mg, 63 μmol , 63 %, weißes Lyophilisat.
- HPLC: 26,03 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 959,42; gef. 960,53 (M+H)⁺.
- ^1H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.22 (s, 2H), 9.12 (s, 2H), 8.20 (t, J=6.1, 1H), 8.14 (d, J=9.1, 1H), 8.06 (t, J=5.4, 1H), 7.74 – 7.67 (m, 5H), 7.38 (d, J=8.2, 2H), 7.09 (d, J=8.9, 2H), 6.36 (d, J=24.2, 2H), 4.37 – 4.21 (m, 4H), 4.16 – 4.10 (m, 1H), 3.89 – 3.81 (m, 4H), 3.63 (t, J=7.8, 1H), 3.52 – 3.35 (m, 13H), 3.25 (t, J=6.3, 2H), 3.12 – 3.03 (m, 3H), 2.90 (dq, J=12.9, 6.6, 1H), 2.86 – 2.76 (m, 2H), 2.67 (dd, J=15.5, 9.8, 1H), 2.61 – 2.55 (m, 1H), 2.35 (dd, J=15.4, 5.0, 1H), 2.04 (t, J=7.4, 2H), 1.85 – 1.68 (m, 4H), 1.63 – 1.41 (m, 8H), 1.34 – 1.24 (m, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 171.88, 171.04, 169.44, 169.00, 165.32, 162.65, 162.18, 158.37, 158.12, 132.65, 128.54, 127.89, 126.92, 126.19, 113.99, 69.70, 69.48, 69.40, 68.07, 67.79, 61.01, 59.98, 59.17, 55.68, 55.36, 50.16, 46.35, 41.66, 35.68, 35.16, 29.37, 28.79, 28.15, 27.99, 25.24, 23.65.

7.9.3 Synthese von $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-CO-Tota-Biotin (MI-908)}$

20) Biotinyl-Tota-H

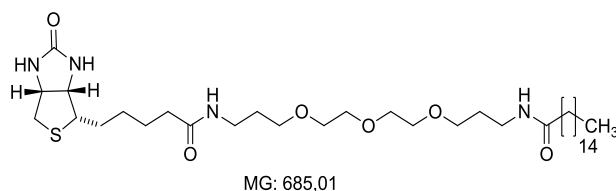


200 mg (0,82 mmol) Biotin und 263 mg (0,82 mmol) Boc-Tota-H wurden in 5 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und mit 363 mg (0,82 mmol) BOP versetzt. Nach Zugabe von 2 Äquiv. DIPEA (280 µL, 1,64 mmol) wurde der Ansatz 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und der Rückstand (farbloses Öl) mit 3 mL TFA für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die TFA wurde weitestgehend i. V. entfernt und das Produkt mittels Säulenchromatographie am Kieselgel 60 gereinigt (Chloroform/Methanol/25 % NH_4OH , 80/20/1, v/v/v, $R_f = 0.41$). Als Anfärbereagenz für die DC-Kontrolle wurde 2%-ige (w/v) p-Dimethylaminozimtaldehyd in schwefelsaurer Ethanollösung (2 % konz. H_2SO_4 in EtOH) verwendet.

Ausbeute: 217 mg, 0,49 mmol, 59,3 %, hellbrauner Feststoff.

- HPLC: 31,05 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 446,72; gef. 447,14 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

21) Biotinyl-Tota-CO-(CH_2)₁₄-CH₃ (MI-908)



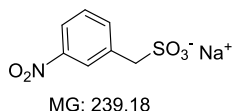
217 mg (0,49 mmol) der Verbindung **20** und 126 mg (0,49 mmol) Palmitinsäure wurden in 3 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und mit einem Äquiv. BOP (216 mg, 0,49 mmol)

versetzt. Nach Zugabe von 2 Äquiv. DIPEA (167 μ L, 0,98 mmol) wurde der Ansatz ca. 30 Minuten bei 0 °C und anschließend ca. drei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Chloroform/Methanol, 8/2, v/v, R_f = 0.65). Die Detektion des Produktes erfolgte wie zuvor für die Verbindung **20** beschrieben.

- Ausbeute: 194 mg, 57,8 %, gelber Feststoff.
- MS: ber. 685,01, gef. 685,35.
- ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) δ = 7.76 – 7.64 (m, 2H), 6.42 – 6.37 (m, 1H), 6.37 – 6.28 (m, 1H), 4.33 – 4.28 (m, 1H), 4.15 – 4.10 (m, 1H), 3.57 – 3.34 (m, 10H), 3.12 – 3.03 (m, 4H), 2.94 (s, 1H), 2.82 (dd, J =12.4, 5.1, 1H), 2.79 (s, 1H), 2.61 – 2.55 (m, 1H), 2.24 (t, J =7.5, 1H), 2.11 – 1.94 (m, 3H), 1.65 – 1.56 (m, 3H), 1.53 – 1.41 (m, 5H), 1.24 (s, 26H), 0.85 (t, J =6.9, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- D_6) δ = 171.91, 171.80, 162.62, 69.73, 69.49, 68.08, 61.00, 59.16, 55.35, 35.65, 35.37, 35.16, 31.22, 29.37, 28.98, 28.96, 28.93, 28.90, 28.88, 28.84, 28.71, 28.63, 28.59, 28.15, 27.98, 25.23, 22.02, 13.86.

7.9.4 Inhibitoren mit D-Aminosäuren in P3-Position

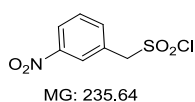
22) Natrium-3-nitrobenzylsulfonat($3\text{-NO}_2\text{-Bzls-O}^- \times \text{Na}^+$) [164]



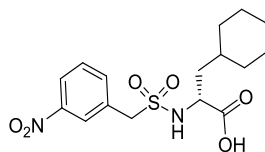
3,50 g (16,20 mmol) 3-Nitrobenzylbromid wurden in 10 mL H₂O suspendiert und mit 2,25 g (17,82 mmol, 1,1 Äquiv.) Na₂SO₃ versetzt. Der Ansatz wurde fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt und der Reaktionsverlauf mittels HPLC kontrolliert. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. V. entfernt (gelber Feststoff). Ein Teil des Rohproduktes wurde für die NMR-Spektroskopie mittels präparativer HPLC gereinigt und aus Wasser lyophilisiert.

- Ausbeute: 5,7 g (Rohprodukt mit Salzen).
- HPLC: 9,58 min (Start bei 10 % B).
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.27 (s, 1H), 8.22 – 8.16 (m, 1H), 8.09 (ddd, J =8.2, 2.4, 1.1, 1H), 7.79 – 7.69 (m, 1H), 7.57 (t, J =7.9, 1H), 3.90 (s, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 147.41, 137.54, 137.16, 129.12, 124.66, 121.40, 56.55.

23) 3-NO₂-Bzls-Cl [164]



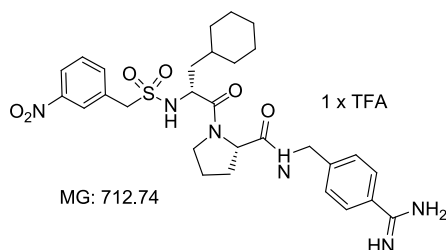
3,6 g (15,05 mmol) des Rohproduktes **22** wurde mit ca. 1 mL Phosphorylchlorid angefeuchtet und unter Eiskühlung mit 3,5 g (16,6 mmol, 1,1 Äquiv.) PCl₅ versetzt. Der Ansatz wurde fünf Minuten bei 0 °C gerührt und anschließend vier Stunden auf dem Ölbad erhitzt (80 °C). Danach wurde das Reaktionsgemisch auf Eis gegossen und 30 Minuten kräftig gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt, i. V. getrocknet und direkt für den nächsten Syntheseschritt verwendet.

24) 3-NO₂-Bzls-D-Cha-OH

MG: 370.42

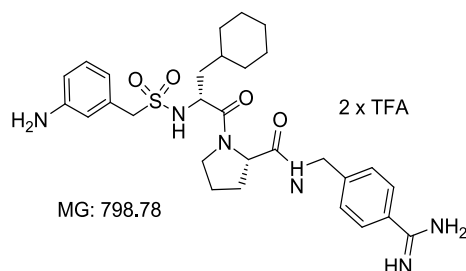
0,92 g (4,62 mmol) D-Cyclohexylalanin wurden in 60 mL trockenem DCM suspendiert und mit 2,3 Äquiv. Trimethylsilylchlorid (1,4 mL, 10,63 mmol) sowie 2,3 Äquiv. DIPEA (1,8 mL, 10,63 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen im Eisbad wurden 1,3 g des Rohproduktes **23** und 1,2 Äquiv. (1,1 mL, 5,54 mmol) DIPEA zugegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und anschließend zwei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (Chloroform/Methanol/AcOH, 90/10/1, v/v/v, R_f = 0.35).

- Ausbeute: 1,24 g, 3,35 mmol, 60,4 %, gelblicher Feststoff.
- HPLC: 42,04 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 370,12; gef. 741,21 (2M+H)⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 12.76 (s, 1H), 8.34 – 8.32 (m, 1H), 8.22 (ddd, J=8.3, 2.4, 1.0, 1H), 7.88 – 7.85 (m, 1H), 7.68 (t, J=7.9, 1H), 7.64 (d, J=8.4, 1H), 4.53 (dd, J=45.1, 13.7, 2H), 3.85 (td, J=8.7, 5.6, 1H), 1.73 (d, J=12.6, 1H), 1.65 – 1.56 (m, 4H), 1.53 – 1.40 (m, 2H), 1.39 – 1.30 (m, 1H), 1.20 – 1.11 (m, 3H), 0.90 – 0.76 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 174.05, 147.56, 137.59, 132.69, 129.65, 125.48, 122.84, 57.46, 53.45, 39.52, 33.06, 32.82, 31.64, 31.25, 25.94, 25.63, 25.47.

25) 3-NO₂-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba × TFA (MI-912)

1,2 g (3,24 mmol) der Verbindung **24** und H-Pro-4-Amba × 2 HCl (1,1 g, 3,24 mmol) wurden in 15 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt, mit einem Äquiv. BOP (1,43 g, 3,24 mmol) und portionsweise mit 2 Äquiv. DIPEA (1,1 mL, 6,48 mmol) versetzt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls durch Zusatz von weiterem DIPEA auf pH 8-9 eingestellt. Der Ansatz wurde zunächst 30 Minuten bei 0 °C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus *tert*-BuOH lyophilisiert.

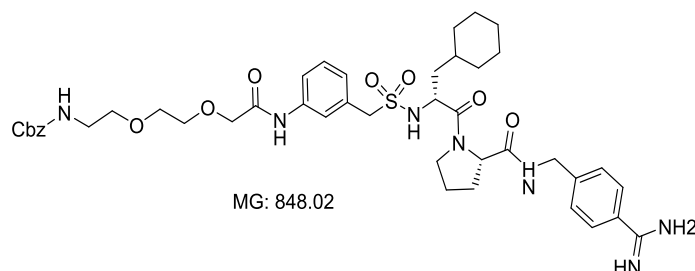
- Ausbeute: 1 g, 1,40 mmol, 44,3 %, weißes Lyophilisat.
- HPLC: 34,62 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 598,26; gef. 599,00 (M+H)⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.15 (s, 2H), 9.04 (s, 2H), 8.60 (t, *J*=6.1, 1H), 8.29 – 8.26 (m, 1H), 8.16 – 8.12 (m, 1H), 7.81 – 7.79 (m, 1H), 7.68 (d, *J*=8.6, 1H), 7.63 – 7.61 (m, 2H), 7.56 (t, *J*=8.0, 1H), 7.40 (d, *J*=8.4, 2H), 4.41 – 4.25 (m, 6H), 3.77 (ddd, *J*=12.5, 7.9, 4.8, 1H), 3.51 (dd, *J*=16.9, 7.3, 1H), 2.21 – 2.13 (m, 1H), 2.05 – 1.92 (m, 2H), 1.91 – 1.85 (m, 1H), 1.81 (d, *J*=11.5, 1H), 1.64 (dt, *J*=18.8, 10.7, 5H), 1.52 – 1.39 (m, 3H), 1.28 – 1.13 (m, 3H), 1.01 – 0.84 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 172.11, 170.55, 165.06, 158.56, 158.31, 147.46, 145.84, 137.62, 132.68, 129.38, 127.81, 127.07, 126.05, 125.52, 122.59, 66.88, 59.97, 57.20, 52.13, 46.83, 41.72, 38.50, 33.32, 33.00, 31.26, 31.18, 30.62, 29.41, 25.99, 25.72, 25.47, 24.36.

26) 3-NH₂-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba × 2 TFA (MI-913)

0,93 g (1,30 mmol) Inhibitor **25** wurden in 15 ml 90%-iger AcOH gelöst und unter einer Argonatmosphäre mit 93 mg (10 % Pd/C) versetzt. Das Argon wurde durch Wasserstoff ersetzt und der Ansatz über Nacht bei RT hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt das Produkt aus *tert*-BuOH lyophilisiert.

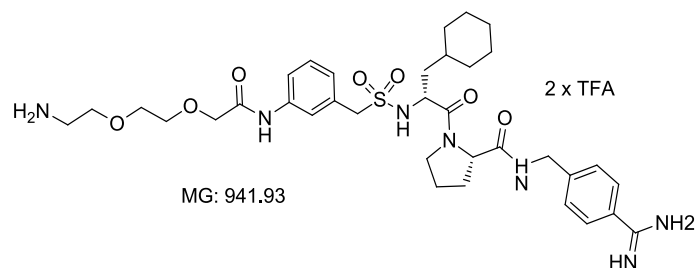
- Ausbeute: 0,87 g, 1,1 mmol, 83,8 %, weißes Lyophilisat.
- HPLC: 24,98 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 568,28; gef. 569,25 (M+H)⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.22 (s, 2H), 9.15 (s, 2H), 8.51 (t, *J*=6.0, 1H), 7.71 – 7.69 (m, 2H), 7.56 – 7.47 (m, 2H), 7.44 (d, *J*=8.4, 2H), 7.20 (t, *J*=8.0, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.93 – 6.90 (m, 1H), 4.36 (dd, *J*=8.5, 3.5, 2H), 4.29 (d, *J*=6.4, 1H), 4.26 (d, *J*=4.3, 1H), 4.20 (td, *J*=9.3, 3.7, 1H), 4.03 (d, *J*=13.7, 1H), 3.74 (ddd, *J*=9.3, 7.7, 4.8, 1H), 3.49 (dd, *J*=16.7, 7.2, 1H), 2.19 – 2.10 (m, 1H), 2.04 – 1.93 (m, 2H), 1.90 – 1.84 (m, 1H), 1.82 – 1.76 (m, 1H), 1.70 – 1.57 (m, 5H), 1.51 – 1.39 (m, 3H), 1.24 – 1.13 (m, 3H), 1.00 – 0.84 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 171.90, 170.56, 165.33, 158.50, 158.23, 145.81, 131.48, 129.05, 127.94, 127.23, 126.30, 117.45, 115.10, 66.88, 59.91, 58.40, 58.39, 52.11, 46.82, 41.65, 33.33, 32.99, 31.35, 31.26, 29.39, 25.99, 25.73, 25.50, 24.36.

27) Cbz-Adoa-3-NH-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba



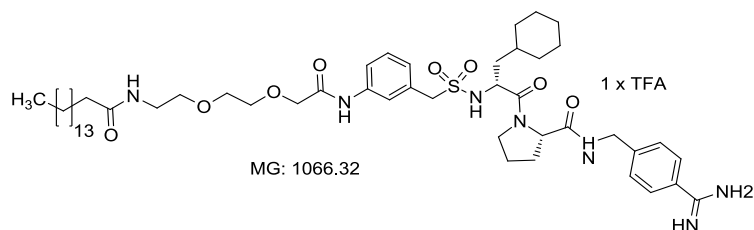
0,5 g (0.63 mmol) des Inhibitors **26** und 187 mg (0.63 mmol) Cbz-Adoa-OH wurden in 10 mL DMF gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit einem Äquiv. BOP (279 mg, 0,63 mmol) versetzt. Nach Zugabe von 2 Äquiv. DIPEA (214 µL, 1,26 mmol) wurde der Ansatz ca. 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und das erhaltene Rohprodukt wurde ohne Reinigung für den nächsten Abspaltungsschritt eingesetzt. Ein Teil des Rückstandes wurde für die NMR-Spektroskopie mittels präparativer HPLC gereinigt und aus tert-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: n.b. (Rohprodukt mit Salzen).
- HPLC: 39,43 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 847,39; gef. 849,34 (M+H)⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.63 (s, 1H, NH), 9.20 (s, 2H), 9.07 (s, 2H), 8.46 (t, J=6.1, 1H), 7.68 (d, J=8.3, 2H), 7.62 (s, 1H), 7.51 (d, J=8.8, 1H), 7.43 (d, J=8.3, 2H), 7.34 (d, J=6.6, 5H), 7.22 (d, J=7.9, 1H), 7.09 (d, J=7.8, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.36 (dd, J=8.4, 3.1, 2H), 4.31 – 4.26 (m, 2H), 4.22 – 4.10 (m, 2H), 4.08 – 4.06 (m, 3H), 3.77 – 3.71 (m, 1H), 3.67 – 3.64 (m, 2H), 3.61 – 3.57 (m, 2H), 3.46 (t, J=6.0, 4H), 3.18 (q, J=5.9, 3H), 2.18 – 0.84 (m, 18H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 171.85, 170.66, 168.19, 165.34, 156.18, 145.83, 138.09, 137.15, 130.77, 128.29, 127.93, 127.68, 127.21, 126.26, 121.93, 119.20, 70.28, 70.17, 69.31, 69.13, 65.19, 59.95, 58.61, 52.12, 46.77, 41.65, 39.52, 33.32, 33.00, 31.38, 29.34, 25.98, 25.72, 25.47, 24.32.

28) Adoa-NH-3-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba × 2 TFA (MI-916)

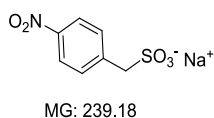
Verbindung **27** wurde mit 3 mL einer 33%-igen Lösung von Bromwasserstoff in AcOH versetzt und der Ansatz bei RT unter gelegentlichem Schütteln 30 Minuten stehen gelassen. Das Lösungsmittel wurde i. V. weitestgehend entfernt, der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus *tert*-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: 0,23 g, 0,244 mmol, 38 %, gelbliches Lyophilisat.
- HPLC: 26,51 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 713,36; gef. 714,37 (M+H)⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.77 – 9.69 (m, 1H), 9.22 (s, 2H), 9.18 (s, 2H), 9.02 – 8.89 (m, 1H), 8.50 (t, *J*=6.1, 1H), 7.96 – 7.78 (m, 3H), 7.73 – 7.67 (m, 2H), 7.62 – 7.59 (m, 2H), 7.52 (d, *J*=8.9, 1H), 7.44 (d, *J*=8.5, 2H), 7.27 – 7.21 (m, 1H), 7.09 (d, *J*=7.7, 1H), 4.41 – 4.34 (m, 2H), 4.31 – 4.26 (m, 2H), 4.25 (d, *J*=5.8, 1H), 4.22 – 4.18 (m, 1H), 4.12 – 4.09 (m, 2H), 4.04 (d, *J*=13.8, 2H), 3.71 – 3.67 (m, 2H), 3.67 – 3.62 (m, 5H), 3.04 – 2.97 (m, 2H), 2.14 (ddd, *J*=17.3, 9.8, 6.1, 1H), 2.06 – 1.91 (m, 2H), 1.87 (ddd, *J*=10.7, 7.3, 4.2, 1H), 1.82 – 1.76 (m, 1H), 1.71 – 1.57 (m, 5H), 1.51 – 1.38 (m, 3H), 1.27 – 1.16 (m, 2H), 0.96 – 0.84 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 171.88, 170.58, 168.19, 165.35, 158.49, 158.23, 145.81, 138.10, 130.78, 128.39, 128.12, 127.93, 127.51, 127.24, 127.21, 126.28, 121.88, 119.22, 117.98, 115.62, 70.10, 69.46, 66.88, 66.64, 59.93, 52.12, 46.81, 41.66, 38.56, 33.32, 33.00, 31.26, 29.37, 25.99, 25.72, 25.49, 24.34.

29) Palmitoyl-Adoa-3-NH-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba × TFA (MI-917)

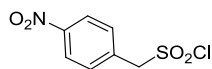
100 mg (0,11 mmol) der Verbindung **28** und 28 mg (0,11 mmol) Palmitinsäure wurden in 2 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und mit einem Äquiv. BOP (49 mg, 0,22 mmol) versetzt. Nach Zugabe von 2 Äquiv. DIPEA (38 µL, 0,22 mmol) wurde der Ansatz 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus 80%-igem *tert*-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: 64 mg, 60 µmol, 54,6%, weißes Lyophilisat.
- HPLC: 29,25 min (Start bei 50 % B).
- MS: ber. 951,59; gef. 952,60 (M+H)⁺.

30) Natrium-4-nitrobenzylsulfonat (4-NO₂-Bzls-O⁻ × Na⁺)

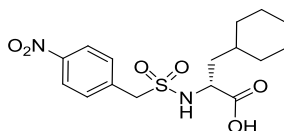
Diese Verbindung wurde, wie für Intermediat **22** beschrieben, aus 3,5 g (16,20 mmol) 4-Nitrobenzylbromid und 2,25 g (17,82 mmol) Natriumsulfit hergestellt.

- Ausbeute: 5,5 g (Rohprodukt mit Salzen).
- HPLC: 8,79 min (Start bei 10 % B).

31) 4-NO₂-Bzls-Cl

MG: 235.64

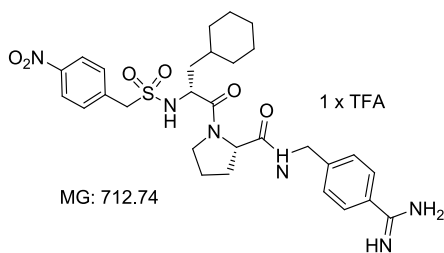
3,6 g (15,05 mmol) der Verbindung **30** wurde mit 1 mL Phosphorylchlorid angefeuchtet und unter Eiskühlung mit 3,5 g (16,6 mmol) PCl₅ versetzt und wie für das Intermediat **23** beschrieben, in das Sulfonylchlorid überführt. Der erhaltene Feststoff wurde ohne weitere Charakterisierung für den nächsten Syntheseschritt verwendet.

32) 4-NO₂-Bzls-D-Cha-OH

MG: 370.42

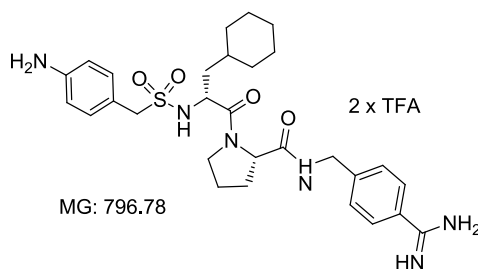
1 g (5,31 mmol) D-Cyclohexylalanin und 1,5 g des Rohproduktes **31** wurden analog der Synthese von Verbindung **24** umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (Chloroform/Methanol/AcOH, 90/10/1, v/v/v, R_f = 0.48).

- Ausbeute: 1,1 g, 2,97 mmol, 55,9 %.
- HPLC: 45,39 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 370,12; gef. 388,16 [M+NH₄]⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 12.75 (s, 1H), 8.25 – 8.22 (m, 2H), 7.71 – 7.68 (m, 3H), 4.52 (dd, J=45.0, 13.5, 2H), 3.83 (td, J=9.0, 5.5, 1H), 1.71 (d, J=12.7, 1H), 1.67 – 1.55 (m, 4H), 1.52 – 1.39 (m, 2H), 1.38 – 1.29 (m, 1H), 1.18 – 1.12 (m, 2H), 0.92 – 0.75 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 174.01, 147.22, 138.04, 132.14, 123.17, 66.88, 57.98, 53.51, 39.52, 33.06, 33.06, 32.83, 31.62, 31.25, 25.93, 25.67, 25.50.

33) 4-NO₂-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba × TFA (MI-914)

Dies Verbindung wurde wie zuvor für das Intermediat **25** beschrieben aus 1,0 g (2,67 mmol) der Verbindung **32** und 0,85 g (2,67 mmol) H-Pro-4-Amba × 2 HCl synthetisiert. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus *tert*-BuOH lyophilisiert.

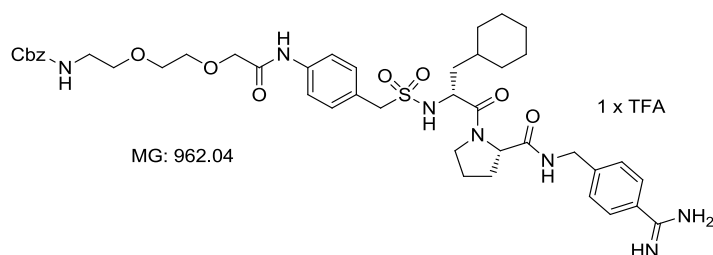
- Ausbeute: 0,86 g, 1,2 mmol, 45,2 %, gelbes Lyophilisat
- HPLC: 36,03 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 598,26; gef. 599,25 [M+H]⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.17 (s, 2H), 9.00 (s, 2H), 8.61 (t, J=6.1, 1H), 8.13 – 8.08 (m, 2H), 7.67 – 7.60 (m, 5H), 7.43 (d, J=8.5, 2H), 4.45 – 4.41 (m, J=3.1, 1H), 4.41 – 4.37 (m, 2H), 4.31 – 4.27 (m, 1H), 4.26 – 4.22 (m, 2H), 3.75 (ddd, J=9.4, 7.8, 4.8, 1H), 3.53 – 3.47 (m, 1H), 2.23 – 2.12 (m, 1H), 2.06 – 1.92 (m, 2H), 1.91 – 1.83 (m, 1H), 1.80 (d, J=11.6, 1H), 1.72 – 1.56 (m, 4H), 1.51 – 1.37 (m, 2H), 1.26 – 1.14 (m, 2H), 1.00 – 0.84 (m, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 172.08, 170.44, 165.04, 158.49, 158.22, 147.02, 145.88, 138.14, 132.17, 128.14, 127.86, 127.09, 126.04, 122.91, 66.88, 59.97, 57.62, 52.12, 46.86, 41.66, 38.62, 33.32, 32.97, 31.26, 31.18, 29.43, 25.99, 25.74, 25.49, 24.37.

34) 4-NH₂-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba × 2 TFA (MI-915)

0,8 g (1,12 mmol) des Intermediates **33** wurden, analog der Synthese von Verbindung **26** mit 80 mg 10 % Pd/C als Katalysator hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Der Rückstand wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus *tert*-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: 0,67 g, 0,84 mmol, 74,9 %, gelbliches Lyophilisat.
- HPLC: 23,09 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 568,28; gef. 569,25 [M+H]⁺.
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ = 9.22 (s, 2H), 9.18 (s, 2H), 8.45 (t, *J*=6.1, 1H), 7.70 (d, *J*=8.4, 2H), 7.44 (d, *J*=8.4, 2H), 7.37 (d, *J*=8.7, 1H), 7.18 (d, *J*=8.4, 2H), 6.79 (d, *J*=8.3, 2H), 4.35 (dd, *J*=8.4, 3.4, 2H), 4.29 (d, *J*=5.8, 1H), 4.23 – 4.13 (m, 2H), 4.01 (s, 1H), 3.76 – 3.70 (m, 1H), 3.48 – 3.41 (m, 1H), 2.17 – 2.09 (m, 1H), 2.01 – 1.92 (m, 2H), 1.88 (tt, *J*=6.8, 4.2, 1H), 1.83 – 1.78 (m, 1H), 1.67 – 1.57 (m, 4H), 1.48 – 1.36 (m, 3H), 1.29 – 1.13 (m, 3H), 0.97 – 0.85 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ = 171.84, 170.76, 165.38, 158.57, 158.31, 145.80, 131.75, 128.11, 127.94, 127.50, 127.23, 126.33, 117.73, 116.87, 115.37, 66.88, 59.92, 58.01, 52.04, 46.76, 41.67, 33.35, 32.97, 31.39, 31.26, 29.34, 26.00, 25.76, 25.51, 24.31.

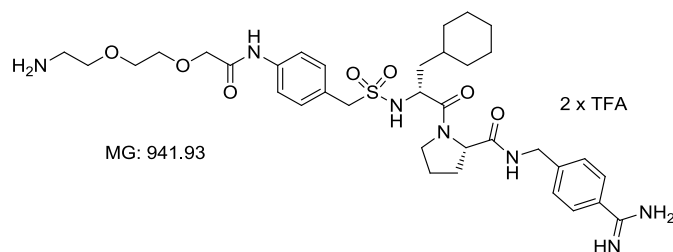
35) Cbz-Adoa-4-NH-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba × TFA



0,5 g (0,63 mmol) des Inhibitors **34** und 190 mg (0,63 mmol) Cbz-Adoa-OH wurden analog der Synthese von Verbindung **27** gekoppelt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt und das erhaltene ölige Rohprodukt wurde ohne Reinigung im nächsten Syntheseschritt entschützt.

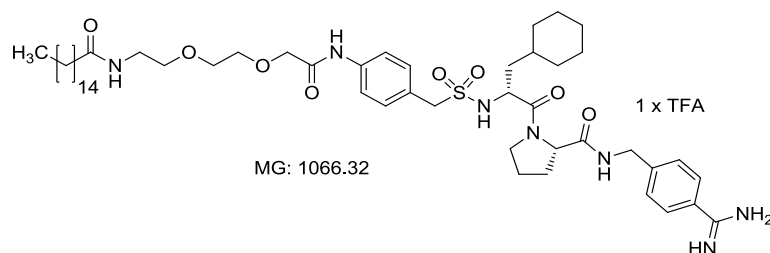
- Ausbeute: n.b.
- HPLC: 39,79 min (Start bei 10 % B).

36) Adoa-4-NH-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba × 2 TFA (MI-918)



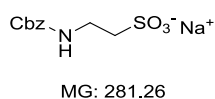
Verbindung **35** wurde analog der Synthese des Inhibitor **27** entschützt. Das Lösungsmittel wurde weitestgehend i. V. entfernt und der verbleibende Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus *tert*-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: 235 mg, 0,25 mmol, 39,6 % , gelbliches Lyophilisat.
- HPLC: 26,21 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 713,36; gef. 714,38 [M+H]⁺.

37) Palmitoyl-Adoa-4-NH-Bzls-D-Cha-Pro-4-Amba × TFA (MI-919)

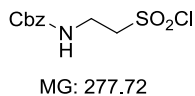
100 mg (0,11 mmol) der Verbindung **36** und 28 mg (0,11 mmol) Palmitinsäure wurden, wie für den Inhibitor **29** beschrieben, umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus 80%-igem *tert*-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: 56 mg, 0,05 mmol, 47,74 %, orangefarbenes Lyophilisat.
- HPLC: 27,83 min (Start bei 50 % B).
- MS: ber. 951,59; gef. 952,67 $[M+H]^+$.

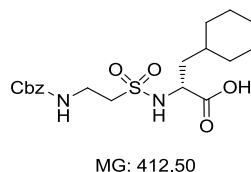
38) Cbz-Taurin × Na⁺ (Cbz-NH(CH₂)₂-SO₃⁻ × Na⁺)

1,46 g (11,7 mmol) Taurin wurden unter Kühlung (0 °C) in 1 N NaOH (11,7 mL, 11,7 mmol) gelöst. Danach wurden gleichzeitig 2 mL (14 mmol, 1,2 Äquiv.) Benzylchloroformiat und 11,7 mL 1 N NaOH tropfenweise hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend noch 30 Minuten bei 0 °C und zwei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt.

- Ausbeute: 4,13 g (Rohprodukt mit Salzen, als Feststoff).
- HPLC: 12,79 min (Start bei 10 % B).

39) 2-*N*-(Cbz)amidoethansulfonylchlorid

800 mg des Rohproduktes **38**, wurden in 1,2 mL Sulfolan und 2,5 mL ACN suspendiert. Danach wurden 665 mg (4,33 mmol, ca. 1,9 Äquiv.) Phosphorylchlorid hinzugegeben und die Reaktionsmischung 40 Minuten lang auf 70 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch in 10 mL Eiswasser gegossen. Das Produkt schied sich, als braunes Öl, am Boden des Becherglases ab. Nach dem Abdekantieren der wässrigen Phase wurde das Öl in DCM aufgenommen, über MgSO₄ getrocknet und in einem Kolben überführt. Das Lösungsmittel wurde im i. V. entfernt und der Rückstand ohne weitere Charakterisierung im nächsten Schritt eingesetzt.

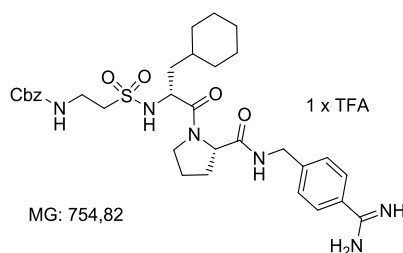
40) 2-*N*-(Cbz)amidoethansulfonyl-D-Cha-OH

0,65 g (3,27 mmol) D-Cyclohexylalanin wurden in 40 mL trockenem DCM suspendiert und mit 2,3 Äquiv. Trimethylsilylchlorid (0,96 mL, 7,52 mmol) sowie 2,3 Äquiv. DIPEA (1,3 mL, 7,52 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen im Eisbad wurden 1,1 g der Verbindung **39** und 1,2 Äquiv. (0,7 mL, 3,92 mmol) DIPEA zugegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und anschließend zwei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und aus *tert*-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: 0,52 g, 1,26 mmol, 38,7 %.
- HPLC: 43,67 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 412,17; gef. 435,11 [M+Na]⁺.

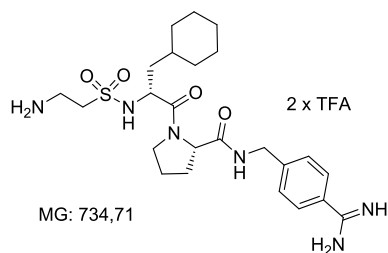
- ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) δ = 12.77 (s, 1H), 7.63 (d, $J=8.8$, 1H), 7.39 – 7.29 (m, 6H), 5.02 (s, 2H), 3.85 (dt, $J=14.2$, 7.1, 1H), 3.42 – 3.35 (m, 2H), 3.17 – 3.07 (m, 2H), 1.79 – 0.77 (m, 13H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- D_6) δ = 174.00, 155.90, 136.94, 128.30 - 127.71, 127.77, 127.71, 65.42, 53.21, 52.26, 35.40, 33.13, 32.93, 31.44, 25.95, 25.68, 25.47.

41) 2-*N*-(Cbz)amidoethansulfonyl-D-Cha-Pro-4-Amba \times TFA (MI-910)



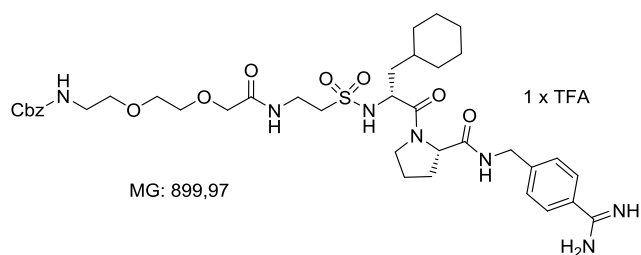
0,5 g (1,21 mmol) der Verbindung **40** und 386 mg (1,21 mmol) H-Pro-4-Amba \times 2 HCl wurden in 2 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und mit einem Äquiv. BOP (0,54 g, 1,21 mmol) versetzt. Nach Zugabe von 2 Äquiv. DIPEA (0,4 mL, 2,42 mmol) wurde der Ansatz 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus 80%-igem *tert*-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: 0,44 g, 0,58 mmol, 48,2 %, weißes Lyophilisat.
- HPLC: 37,12 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 640,79; gef. 641,20 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) δ = 8.60 – 8.01 (m, 4H), 7.94 (s, 1H), 7.50 (s, 2H), 7.39 – 7.09 (m, 7H), 6.50 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 4.89 (dd, $J=41.5$, 11.5, 2H), 4.67 – 4.08 (m, 6H), 3.80 (s, 1H), 3.50 – 3.06 (m, 4H), 2.30 – 0.80 (m, 20H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- D_6) δ = 172.94, 172.52, 159.56, 159.24, 156.85, 145.54, 136.29, 128.60, 128.24, 127.91, 116.27, 77.41, 77.16, 77.16, 76.91, 70.18, 66.91, 61.11, 52.66, 47.73, 42.85, 34.04, 33.53, 31.16, 31.16, 31.15, 31.14, 31.14, 29.83, 26.42, 26.20, 25.93, 24.83.

42) 2-Aminoethansulfonyl-D-Cha-Pro-4-Amba × 2 TFA (MI-911)

Verbindung **41** (364 mg, 0,48 mmol) wurde mit 3 mL einer 32%-igen Lösung von Bromwasserstoff in AcOH versetzt und der Ansatz bei RT unter gelegentlichem Schütteln ca. 30 Minuten stehen gelassen. Das Lösungsmittel wurde weitestgehend i. V. entfernt und der verbleibende Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus *tert*-BuOH lyophilisiert.

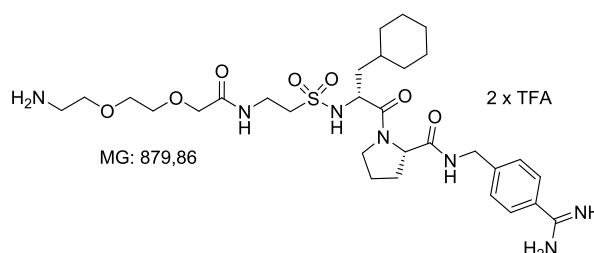
- Ausbeute: 256 mg, 0,41 mmol, 72,6 %, gelbes Lyophilisat.
- HPLC: 21,46 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 506,27; gef. 507,12 $[M+H]^+$.

43) Cbz-Adoa-2-Amidoethansulfonyl-D-Cha-Pro-4-Amba × TFA

200 mg (0,27 mmol) der Verbindung **42** und 80,3 mg (0,27 mmol) Cbz-Adoa-OH wurden in 2 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und mit einem Äquiv. BOP (119 mg, 0,27 mmol) versetzt. Nach Zugabe von 2 Äquiv. DIPEA (92 µL, 0,54 mmol) wurde der Ansatz 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus 80%-igem *tert*-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: n.b.
- HPLC: 33,66 min (Start bei 10 % B).
- ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) δ = 9.32 – 9.16 (m, 2H), 9.11 – 8.99 (m, 2H), 8.59 (t, $J=6.0$, 1H), 7.74 (d, $J=8.3$, 2H), 7.62 – 7.56 (m, 2H), 7.48 (d, $J=8.2$, 2H), 7.39 – 7.28 (m, 5H), 7.22 (t, $J=5.2$, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.50 (dd, $J=16.2$, 6.5, 1H), 4.35 – 4.25 (m, 2H), 4.15 (td, $J=9.8$, 3.6, 1H), 3.89 – 3.53 (m, 8H), 3.42 – 2.94 (m, 8H), 2.19 – 1.79 (m, 4H), 1.73 – 0.72 (m, 15H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- D_6) δ = 172.01, 170.39, 169.17, 165.40, 158.46, 158.21, 156.16, 145.84, 137.14, 128.29, 128.14, 128.00, 127.71, 127.67, 127.49, 127.11, 126.35, 70.11, 69.86, 69.23, 69.11, 66.88, 65.21, 59.97, 51.80, 50.98, 46.84, 41.57, 40.02, 39.85, 39.69, 39.52, 39.52, 39.35, 39.19, 39.02, 33.36, 33.19, 33.04, 33.01, 31.26, 31.09, 29.41, 26.00, 25.76, 25.48, 24.38.

44) Adoa-2-Amidoethansulfonyl-D-Cha-Pro-4-Amba \times 2 TFA (MI-920)

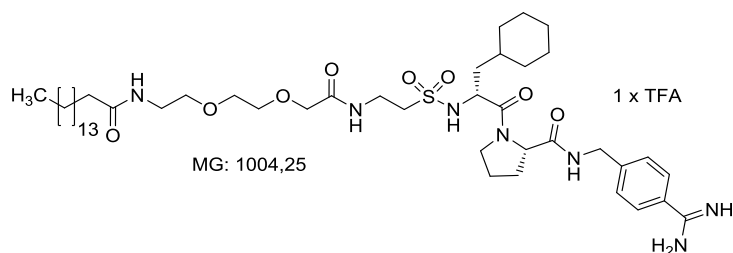


Verbindung **43** wurde mit 3 mL einer 32%-iger Lösung von Bromwasserstoff in AcOH versetzt und der Ansatz bei RT unter gelegentlichem Schütteln 30 Minuten stehen gelassen. Das Lösungsmittel wurde i. V. weitestgehend entfernt, und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus *tert*-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: 150 mg, 0,17 mmol, 63,1 % (über zwei Stufen Verbindungen **43** und **44**), weißes Lyophilisat.
- HPLC: 23,69 min (Start bei 10 % B).
- MS: ber. 651,34; gef. 652,82 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) δ = 9.26 – 9.17 (m, 4H), 8.63 (t, $J=6.1$, 1H), 7.94 – 7.78 (m, 3H), 7.79 – 7.73 (m, 2H), 7.66 – 7.59 (m, 2H), 7.48 (d, $J=8.4$, 2H), 4.48 (dd, $J=16.2$, 6.5, 1H), 4.38 – 4.25 (m, 2H), 4.21 – 4.09 (m, 1H), 3.93 – 3.39 (m, 11H), 3.34 – 2.92 (m, 5H), 2.20 – 1.78 (m, 4H), 1.72 – 0.78 (m, 15H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- D_6)

$\delta = 172.01, 170.37, 169.16, 165.50, 158.48, 158.22, 145.79, 128.11, 128.00, 127.50, 127.12, 126.42, 70.01, 69.97, 69.80, 69.43, 69.38, 66.88, 66.63, 59.96, 51.83, 51.00, 46.85, 41.57, 33.34, 33.07, 33.01, 31.07, 31.06, 29.43, 25.99, 25.75, 25.48, 24.38.$

45) Palmitoyl-Adoa-2-Amidoethansulfonyl-D-Cha-Pro-4-Amba \times TFA (MI-921)



100 mg (0,11 mmol) der Verbindung **44** und 28 mg (0,11 mmol) Palmitinsäure wurden in 2 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und mit einem Äquiv. BOP (49 mg, 0,11 mmol) versetzt. Nach Zugabe von 2 Äquiv. DIPEA (38 μ L, 0,22 mmol) wurde der Ansatz 30 Minuten bei 0 °C und anschließend drei Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. V. entfernt, der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und das Produkt aus 80%-igem *tert*-BuOH lyophilisiert.

- Ausbeute: 73 mg, 0,08 mmol, 66,1 %, weißes Lyophilisat.
- HPLC: 27,61 min (Start bei 50 % B).
- MS: ber. 889,57; gef. 890,12 $[M+H]^+$.

Literaturverzeichnis

1. Di, L., *Strategic Approaches to Optimizing Peptide ADME Properties*. AAPS J, **2015**. 17(1): p. 134-143.
2. Fosgerau, K. and Hoffmann, T., *Peptide therapeutics: current status and future directions*. Drug discovery today, **2015**. 20(1): p. 122-128.
3. Rezai, T., Bock, J. E., Zhou, M. V., Kalyanaraman, C., Lokey, R. S., and Jacobson, M. P., *Conformational flexibility, internal hydrogen bonding, and passive membrane permeability: successful in silico prediction of the relative permeabilities of cyclic peptides*. J Am Chem Soc, **2006**. 128(43): p. 14073-14080.
4. Werle, M. and Bernkop-Schnurch, A., *Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs*. Amino Acids, **2006**. 30(4): p. 351-367.
5. Sato, A. K., Viswanathan, M., Kent, R. B., and Wood, C. R., *Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development*. Curr Opin Biotechnol, **2006**. 17(6): p. 638-642.
6. Lichun, S., *Peptide-Based Drug Development*. Mod Chem Appl., **2013**. 1(1): p. 1-2.
7. Uhlig, T., Kyprianou, T., Martinelli, F. G., Oppici, C. A., Heiligers, D., Hills, D., Calvo, X. R., and Verhaert, P., *The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation*. EuPA Open Proteomics, **2014**. 4: p. 58-69.
8. Mullard, A., *Clinuvel's tanning agent nears approval for porphyria*. Nat Biotech, **2015**. 33(1): p. 7-7.
9. Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., and Khrestchatisky, M., *Synthetic therapeutic peptides: science and market*. Drug Discov Today, **2010**. 15(1-2): p. 40-56.
10. Brinckerhoff, L. H., Kalashnikov, V. V., Thompson, L. W., Yamshchikov, G. V., Pierce, R. A., Galavotti, H. S., Engelhard, V. H., and Slingluff, C. L., Jr., *Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-1(27-35) peptide: implications for peptide vaccines*. Int J Cancer, **1999**. 83(3): p. 326-334.

11. Ferdinandi, E. S., Brazeau, P., High, K., Procter, B., Fennell, S., and Dubreuil, P., *Non-clinical pharmacology and safety evaluation of TH9507, a human growth hormone-releasing factor analogue*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, **2007**. 100(1): p. 49-58.
12. Thatcher, W. W., Drost, M., Savio, J. D., Macmillan, K. L., Entwistle, K. W., Schmitt, E. J., De la Sota, R. L., and Morris, G. R., *Current Advances in the Manipulation of Reproductive Function in Domestic Animals New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle*. Animal Reproduction Science, **1993**. 33(1): p. 27-49.
13. Raun, K., Hansen, B. S., Johansen, N. L., Thogersen, H., Madsen, K., Ankersen, M., and Andersen, P. H., *Ipamorelin, the first selective growth hormone secretagogue*. Eur J Endocrinol, **1998**. 139(5): p. 552-561.
14. Gobburu, J. V., Agerso, H., Jusko, W. J., and Ynddal, L., *Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of ipamorelin, a growth hormone releasing peptide, in human volunteers*. Pharm Res, **1999**. 16(9): p. 1412-1416.
15. Powell, M. F., Stewart, T., Otvos, L., Jr., Urge, L., Gaeta, F. C., Sette, A., Arrhenius, T., Thomson, D., Soda, K., and Colon, S. M., *Peptide stability in drug development. II. Effect of single amino acid substitution and glycosylation on peptide reactivity in human serum*. Pharm Res, **1993**. 10(9): p. 1268-1273.
16. Darlak, K., Benovitz, D. E., Spatola, A. F., and Grzonka, Z., *Dermorphin analogs: resistance to in vitro enzymatic degradation is not always increased by additional D-amino acid substitutions*. Biochemical and biophysical research communications, **1988**. 156(1): p. 125-130.
17. Gongora-Benitez, M., Tulla-Puche, J., and Albericio, F., *Multifaceted roles of disulfide bonds. Peptides as therapeutics*. Chem Rev, **2014**. 114(2): p. 901-926.
18. Goodwin, D., Simerska, P., and Toth, I., *Peptides as therapeutics with enhanced bioactivity*. Current medicinal chemistry, **2012**. 19(26): p. 4451-4461.
19. Davies, J. S., *The cyclization of peptides and depsipeptides*. Journal of Peptide Science, **2003**. 9(8): p. 471-501.

20. Sand, K. M., Bern, M., Nilsen, J., Noordzij, H. T., Sandlie, I., and Andersen, J. T., *Unraveling the Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics*. *Frontiers in immunology*, **2014**. 5: p. 682.
21. Pollaro, L. and Heinis, C., *Strategies to prolong the plasma residence time of peptide drugs*. *MedChemComm*, **2010**. 1(5): p. 319-324.
22. Roopenian, D. C. and Akilesh, S., *FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age*. *Nat Rev Immunol*, **2007**. 7(9): p. 715-725.
23. Anderson, C. L., Chaudhury, C., Kim, J., Bronson, C. L., Wani, M. A., and Mohanty, S., *Perspective- FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine*. *Trends Immunol*, **2006**. 27(7): p. 343-348.
24. Elsadek, B. and Kratz, F., *Impact of albumin on drug delivery — New applications on the horizon*. *Journal of Controlled Release*, **2012**. 157(1): p. 4-28.
25. Kratz, F., *Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles*. *J Control Release*, **2008**. 132(3): p. 171-183.
26. Baggio, L. L., Huang, Q., Cao, X., and Drucker, D. J., *An albumin-exendin-4 conjugate engages central and peripheral circuits regulating murine energy and glucose homeostasis*. *Gastroenterology*, **2008**. 134(4): p. 1137-1147.
27. Baggio, L. L., Huang, Q., Brown, T. J., and Drucker, D. J., *A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (albugon) mimics peptidergic activation of GLP-1 receptor-dependent pathways coupled with satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis*. *Diabetes*, **2004**. 53(9): p. 2492-2500.
28. Bush, M. A., Matthews, J. E., De Boever, E. H., Dobbins, R. L., Hodge, R. J., Walker, S. E., Holland, M. C., Gutierrez, M., and Stewart, M. W., *Safety, tolerability, pharmacodynamics and pharmacokinetics of albiglutide, a long-acting glucagon-like peptide-1 mimetic, in healthy subjects*. *Diabetes Obes Metab*, **2009**. 11(5): p. 498-505.

29. Kurtzhals, P., Havelund, S., Jonassen, I., Kiehr, B., Larsen, U. D., Ribel, U., and Markussen, J., *Albumin binding of insulins acylated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect in vivo*. *Biochem J*, **1995**. 312 (Pt 3): p. 725-731.
30. Trussel, S., Dumelin, C., Frey, K., Villa, A., Buller, F., and Neri, D., *New strategy for the extension of the serum half-life of antibody fragments*. *Bioconjug Chem*, **2009**. 20(12): p. 2286-2292.
31. Dumelin, C. E., Trussel, S., Buller, F., Trachsel, E., Bootz, F., Zhang, Y., Mannocci, L., Beck, S. C., Drumea-Mirancea, M., Seeliger, M. W., Baltes, C., Muggler, T., Kranz, F., Rudin, M., Melkko, S., Scheuermann, J., and Neri, D., *A portable albumin binder from a DNA-encoded chemical library*. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2008**. 47(17): p. 3196-3201.
32. Zobel, K., Koehler, M. F., Beresini, M. H., Caris, L. D., and Combs, D., *Phosphate ester serum albumin affinity tags greatly improve peptide half-life in vivo*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2003**. 13(9): p. 1513-1515.
33. Koehler, M. F., Zobel, K., Beresini, M. H., Caris, L. D., Combs, D., Paasch, B. D., and Lazarus, R. A., *Albumin affinity tags increase peptide half-life in vivo*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2002**. 12(20): p. 2883-2886.
34. Malm-Erfjelt, M., Bjornsdottir, I., Vanggaard, J., Helleberg, H., Larsen, U., Oosterhuis, B., van Lier, J. J., Zdravkovic, M., and Olsen, A. K., *Metabolism and excretion of the once-daily human glucagon-like peptide-1 analog liraglutide in healthy male subjects and its in vitro degradation by dipeptidyl peptidase IV and neutral endopeptidase*. *Drug Metab Dispos*, **2010**. 38(11): p. 1944-1953.
35. Abuchowski, A., McCoy, J. R., Palczuk, N. C., van Es, T., and Davis, F. F., *Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase*. *The Journal of biological chemistry*, **1977**. 252(11): p. 3582-3586.
36. Roberts, M. J., Bentley, M. D., and Harris, J. M., *Chemistry for peptide and protein PEGylation*. *Adv Drug Deliv Rev*, **2002**. 54(4): p. 459-476.

37. Rosendahl, M. S., Doherty, D. H., Smith, D. J., Carlson, S. J., Chlipala, E. A., and Cox, G. N., *A Long-Acting, Highly Potent Interferon α -2 Conjugate Created Using Site-Specific PEGylation*. *Bioconjugate Chemistry*, **2005**. 16(1): p. 200-207.
38. Veronese, F. M. and Pasut, G., *PEGylation, successful approach to drug delivery*. *Drug Discov Today*, **2005**. 10(21): p. 1451-1458.
39. Alconcel, S. N. S., Baas, A. S., and Maynard, H. D., *FDA-approved poly(ethylene glycol)-protein conjugate drugs*. *Polymer Chemistry*, **2011**. 2(7): p. 1442-1448.
40. Sandborn, W. J., Feagan, B. G., Stoinov, S., Honiball, P. J., Rutgeerts, P., Mason, D., Bloomfield, R., Schreiber, S., and Investigators, P. S., *Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease*. *The New England journal of medicine*, **2007**. 357(3): p. 228-238.
41. Crawford, J., *Pegfilgrastim administered once per cycle reduces incidence of chemotherapy-induced neutropenia*. *Drugs*, **2002**. 62 Suppl 1: p. 89-98.
42. Shepherd, J., Brodin, H., Cave, C., Waugh, N., Price, A., and Gabbay, J., *Pegylated interferon alpha-2a and -2b in combination with ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C: a systematic review and economic evaluation*. *Health technology assessment (Winchester, England)*, **2004**. 8(39): p. 1-125.
43. Veronese, F. M. and Pasut, G., *PEGylation, successful approach to drug delivery*. *Drug Discovery Today*, **2005**. 10(21): p. 1451-1458.
44. Pelegri-O'Day, E. M., Lin, E.-W., and Maynard, H. D., *Therapeutic Protein-Polymer Conjugates: Advancing Beyond PEGylation*. *Journal of the American Chemical Society*, **2014**. 136(41): p. 14323-14332.
45. Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., and Schubert, U. S., *Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*. *Angewandte Chemie*, **2010**. 49(36): p. 6288-6308.
46. Gaberc-Porekar, V., Zore, I., Podobnik, B., and Menart, V., *Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins*. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **2008**. 11(2): p. 242-250.

47. Baumann, A., Tuerck, D., Prabhu, S., Dickmann, L., and Sims, J., *Pharmacokinetics, metabolism and distribution of PEGs and PEGylated proteins: quo vadis?* Drug Discovery Today, **2014**. 19(10): p. 1623-1631.
48. Bendele, A., Seely, J., Richey, C., Sennello, G., and Shopp, G., *Short communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins*. Toxicol Sci, **1998**. 42(2): p. 152-157.
49. Schlapschy, M., Binder, U., Borger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D., and Skerra, A., *PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins*. Protein Eng Des Sel, **2013**. 26(8): p. 489-501.
50. Schlapschy, M., Theobald, I., Mack, H., Schottelius, M., Wester, H. J., and Skerra, A., *Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino-acid polymer: effects on biophysical properties and prolonged plasma half-life*. Protein Eng Des Sel, **2007**. 20(6): p. 273-284.
51. Silvana Di Cesare, U. B., Thomas Maier, and Arne Skerra, *High-Yield Production of PASylated Human Growth Hormone Using Secretory E. coli Technology*. BioProcess International, **2013**. 11(4): 30-38.
52. Liebner, R., Mathaes, R., Meyer, M., Hey, T., Winter, G., and Besheer, A., *Protein HESylation for half-life extension: synthesis, characterization and pharmacokinetics of HESylated anakinra*. Eur J Pharm Biopharm, **2014**. 87(2): p. 378-385.
53. Khaksa, G., D'Souza, R., Lewis, S., and Udupa, N., *Pharmacokinetic study of niosome encapsulated insulin*. Indian J Exp Biol, **2000**. 38(9): p. 901-905.
54. Bangham, A. D. and Horne, R. W., *Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope*. J Mol Biol, **1964**. 8: p. 660-668.
55. Horne, R. W., Bangham, A. D., and Whittaker, V. P., *Negatively stained lipoprotein membranes*. Nature, **1963**. 200: p. 1340.
56. Papahadjopoulos, D. and Bangham, A. D., *Biophysical properties of phospholipids. II. Permeability of phosphatidylserine liquid crystals to univalent ions*. Biochim Biophys Acta, **1966**. 126(1): p. 185-188.

57. Sessa, G. and Weissmann, G., *Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes*. J Lipid Res, **1968**. 9(3): p. 310-318.
58. Bitounis, D., Fanciullino, R., Iliadis, A., and Ciccolini, J., *Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept*. ISRN pharmaceutics, **2012**. 2012: p. 738432.
59. Inoue, K., *Permeability properties of liposomes prepared from dipalmitoyllecithin, dimyristoyllecithin, egg lecithin, rat liver lecithin and beef brain sphingomyelin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, **1974**. 339(3): p. 390-402.
60. Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., and Deng, Y., *A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, **2015**. 10(2): p. 81-98.
61. Gregoriadis, G. and Senior, J., *The phospholipid component of small unilamellar liposomes controls the rate of clearance of entrapped solutes from the circulation*. FEBS Letters, **1980**. 119(1): p. 43-46.
62. Melchior, D. L. and Steim, J. M., *Thermotropic transitions in biomembranes*. Annu Rev Biophys Bioeng, **1976**. 5: p. 205-238.
63. Knowles, P. F. and Marsh, D., *Magnetic resonance of membranes*. Biochem J, **1991**. 274 (Pt 3): p. 625-641.
64. de Gier, J., Mandersloot, J. G., and van Deenen, L. L., *Lipid composition and permeability of liposomes*. Biochim Biophys Acta, **1968**. 150(4): p. 666-675.
65. Demel, R. A., Kinsky, S. C., Kinsky, C. B., and van Deenen, L. L., *Effects of temperature and cholesterol on the glucose permeability of liposomes prepared with natural and synthetic lecithins*. Biochim Biophys Acta, **1968**. 150(4): p. 655-665.
66. Miller, C. R., Bondurant, B., McLean, S. D., McGovern, K. A., and O'Brien, D. F., *Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes*. Biochemistry, **1998**. 37(37): p. 12875-12883.
67. Düzgüneş, N. and Nir, S., *Mechanisms and kinetics of liposome–cell interactions*. Advanced Drug Delivery Reviews, **1999**. 40(1–2): p. 3-18.

68. Sessa, G. and Weissmann, G., *Incorporation of lysozyme into liposomes. A model for structure-linked latency*. J Biol Chem, **1970**. 245(13): p. 3295-3301.
69. Allen, T. M. and Cullis, P. R., *Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, **2013**. 65(1): p. 36-48.
70. Semple, S. C., Chonn, A., and Cullis, P. R., *Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes*. Biochemistry, **1996**. 35(8): p. 2521-2525.
71. Senior, J. H., *Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors*. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, **1987**. 3(2): p. 123-193.
72. Kulkarni, S. B., Betageri, G. V., and Singh, M., *Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes*. J Microencapsul, **1995**. 12(3): p. 229-246.
73. Scherphof, G. L., Dijkstra, J., Spanjer, H. H., Derksen, J. T., and Roerdink, F. H., *Uptake and intracellular processing of targeted and nontargeted liposomes by rat Kupffer cells in vivo and in vitro*. Ann N Y Acad Sci, **1985**. 446: p. 368-384.
74. Immordino, M. L., Dosio, F., and Cattel, L., *Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential*. International Journal of Nanomedicine, **2006**. 1(3): p. 297-315.
75. Patel, H. M., *Influence of lipid composition on opsonophagocytosis of liposomes*. Res Immunol, **1992**. 143(2): p. 242-244.
76. Falcone, D. J., *Fluorescent opsonization assay: binding of plasma fibronectin to fibrin-derivatized fluorescent particles does not enhance their uptake by macrophages*. J Leukoc Biol, **1986**. 39(1): p. 1-12.
77. Thiagarajan, P., Le, A., and Benedict, C. R., *Beta(2)-glycoprotein I promotes the binding of anionic phospholipid vesicles by macrophages*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, **1999**. 19(11): p. 2807-2811.
78. Volanakis, J. E. and Narkates, A. J., *Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers and complement*. J Immunol, **1981**. 126(5): p. 1820-1825.

79. Scherphof, G., Roerdink, F., Waite, M., and Parks, J., *Disintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interaction with high-density lipoproteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, **1978**. 542(2): p. 296-307.
80. Chobanian, J. V., Tall, A. R., and Brecher, P. I., *Interaction between unilamellar egg yolk lecithin vesicles and human high density lipoprotein*. Biochemistry, **1979**. 18(1): p. 180-187.
81. Damen, J., Regts, J., and Scherphof, G., *Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoproteins. Dependence on cholesterol content and phospholipid composition*. Biochim Biophys Acta, **1981**. 665(3): p. 538-545.
82. Senior, J. and Gregoriadis, G., *Is half-life of circulating liposomes determined by changes in their permeability?* FEBS Letters, **1982**. 145(1): p. 109-114.
83. Gabizon, A. and Papahadjopoulos, D., *Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors*. Proc Natl Acad Sci USA, **1988**. 85(18): p. 6949-6953.
84. Allen, T. M., Hansen, C., and Rutledge, J., *Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues*. Biochim Biophys Acta, **1989**. 981(1): p. 27-35.
85. Allen, T. M. and Chonn, A., *Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system*. FEBS Lett, **1987**. 223(1): p. 42-46.
86. Maeda, H., Sawa, T., and Konno, T., *Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS*. J Control Release, **2001**. 74(1-3): p. 47-61.
87. Matsumura, Y. and Maeda, H., *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. Cancer Res, **1986**. 46(12 Pt 1): p. 6387-6392.

-
88. Maeda, H., *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting*. Adv Enzyme Regul, **2001**. 41: p. 189-207.
89. Torchilin, V. P., *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*. Nature reviews. Drug discovery, **2005**. 4(2): p. 145-160.
90. Seymour, L. W., *Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates*. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, **1992**. 9(2): p. 135-187.
91. Torchilin, V. P., *Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery*. Nat Rev Drug Discov, **2014**. 13(11): p. 813-827.
92. Needham, D., McIntosh, T. J., and Lasic, D. D., *Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes*. Biochim Biophys Acta, **1992**. 1108(1): p. 40-48.
93. Torchilin, V. P., Omelyanenko, V. G., Papisov, M. I., Bogdanov Jr, A. A., Trubetskoy, V. S., Herron, J. N., and Gentry, C. A., *Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, **1994**. 1195(1): p. 11-20.
94. Torchilin, V. P., Shtilman, M. I., Trubetskoy, V. S., Whiteman, K., and Milstein, A. M., *Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo*. Biochim Biophys Acta, **1994**. 1195(1): p. 181-184.
95. Torchilin, V. P., Trubetskoy, V. S., Whiteman, K. R., Caliceti, P., Ferruti, P., and Veronese, F. M., *New synthetic amphiphilic polymers for steric protection of liposomes in vivo*. J Pharm Sci, **1995**. 84(9): p. 1049-1053.
96. Woodle, M. C., Engbers, C. M., and Zalipsky, S., *New amphipatic polymer-lipid conjugates forming long-circulating reticuloendothelial system-evading liposomes*. Bioconjug Chem, **1994**. 5(6): p. 493-496.
97. Sapra, P. and Allen, T. M., *Ligand-targeted liposomal anticancer drugs*. Prog Lipid Res, **2003**. 42(5): p. 439-462.
98. Medina, O. P., Zhu, Y., and Kairemo, K., *Targeted liposomal drug delivery in cancer*. Curr Pharm Des, **2004**. 10(24): p. 2981-2989.

99. Allen, T. M., Agrawal, A. K., Ahmad, I., Hansen, C. B., and Zalipsky, S., *Antibody-Mediated Targeting of Long-Circulating (StealthR) Liposomes*. Journal of Liposome Research, **1994**. 4(1): p. 1-25.
100. Loughrey, H., Bally, M. B., and Cullis, P. R., *A non-covalent method of attaching antibodies to liposomes*. Biochim Biophys Acta, **1987**. 901(1): p. 157-160.
101. Loughrey, H. C., Choi, L. S., Cullis, P. R., and Bally, M. B., *Optimized procedures for the coupling of proteins to liposomes*. J Immunol Methods, **1990**. 132(1): p. 25-35.
102. Loughrey, H. C., Ferraretto, A., Cannon, A.-M., Acerbis, G., Sudati, F., Bottiroli, G., Masserini, M., and Soria, M. R., *Characterisation of biotinylated liposomes for in vivo targeting applications*. FEBS Letters, **1993**. 332(1-2): p. 183-188.
103. Kung, V. T. and Redemann, C. T., *Synthesis of carboxyacetyl derivatives of phosphatidylethanolamine and use as an efficient method for conjugation of protein to liposomes*. Biochim Biophys Acta, **1986**. 862(2): p. 435-439.
104. Martin, F. J. and Papahadjopoulos, D., *Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting*. The Journal of biological chemistry, **1982**. 257(1): p. 286-288.
105. Heeremans, J. L., Kraaijenga, J. J., Los, P., Kluft, C., and Crommelin, D. J., *Development of a procedure for coupling the homing device glu-plasminogen to liposomes*. Biochim Biophys Acta, **1992**. 1117(3): p. 258-264.
106. Martin, F. J., Hubbell, W. L., and Papahadjopoulos, D., *Immunospecific targeting of liposomes to cells: a novel and efficient method for covalent attachment of Fab' fragments via disulfide bonds*. Biochemistry, **1981**. 20(14): p. 4229-4238.
107. Duncan, R. J., Weston, P. D., and Wrigglesworth, R., *A new reagent which may be used to introduce sulfhydryl groups into proteins, and its use in the preparation of conjugates for immunoassay*. Anal Biochem, **1983**. 132(1): p. 68-73.
108. Frisch, B., Boeckler, C., and Schuber, F., *Synthesis of Short Polyoxyethylene-Based Heterobifunctional Cross-Linking Reagents. Application to the Coupling of Peptides to Liposomes*. Bioconjugate Chemistry, **1996**. 7(2): p. 180-186.

109. Hansen, C. B., Kao, G. Y., Moase, E. H., Zalipsky, S., and Allen, T. M., *Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures*. Biochim Biophys Acta, **1995**. 1239(2): p. 133-144.
110. Huwyler, J., Wu, D., and Pardridge, W. M., *Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **1996**. 93(24): p. 14164-14169.
111. Maruyama, K., Takahashi, N., Tagawa, T., Nagaike, K., and Iwatsuru, M., *Immunoliposomes bearing polyethyleneglycol-coupled Fab' fragment show prolonged circulation time and high extravasation into targeted solid tumors in vivo*. FEBS Letters, **1997**. 413(1): p. 177-180.
112. Kley, J. T., Fichert, T., and Massing, U., *Synthesis of Novel Thiol-Reactive Amphiphilic Lipids Based on Cholesterol for Protein-Liposome Coupling*. Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly, **1998**. 129(3): p. 319-327.
113. Gabizon, A., Horowitz, A. T., Goren, D., Tzemach, D., Mandelbaum-Shavit, F., Qazen, M. M., and Zalipsky, S., *Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: in vitro studies*. Bioconjug Chem, **1999**. 10(2): p. 289-298.
114. Bendas, G., Krause, A., Bakowsky, U., Vogel, J., and Rothe, U., *Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique*. Int J Pharm, **1999**. 181(1): p. 79-93.
115. Monroe, D. M. and Hoffman, M., *What does it take to make the perfect clot? Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **2006**. 26(1): p. 41-48.
116. Kjalke, M., Oliver, J. A., Monroe, D. M., Hoffman, M., Ezban, M., Hedner, U., and Roberts, H. R., *The effect of active site-inhibited factor VIIa on tissue factor-initiated coagulation using platelets before and after aspirin administration*. Thrombosis and haemostasis, **1997**. 78(4): p. 1202-1208.
117. Andrews, R. K., Shen, Y., Gardiner, E. E., Dong, J.-f., López, J. A., and Berndt, M. C., *The Glycoprotein Ib-IX-V Complex in Platelet Adhesion and Signaling*. Thrombosis and haemostasis, **1999**. 82(8): p. 357-364.

118. Davie, E. W., Fujikawa, K., and Kisiel, W., *The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation*. Biochemistry, **1991**. 30(43): p. 10363-10370.
119. Triplett, D. A., *Coagulation and bleeding disorders: review and update*. Clin Chem, **2000**. 46(8 Pt 2): p. 1260-1269.
120. van Hinsbergh, V. W. M., *Endothelium - role in regulation of coagulation and inflammation*. Seminars in Immunopathology, **2012**. 34(1): p. 93-106.
121. Norris, L. A., *Blood coagulation*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, **2003**. 17(3): p. 369-383.
122. Vogler, E. A. and Siedlecki, C. A., *Contact Activation of Blood Plasma Coagulation: A Contribution from the Hematology at Biomaterial Interfaces Research Group The Pennsylvania State University*. Biomaterials, **2009**. 30(10): p. 1857-1869.
123. Al-Horani, R. A. and Desai, U. R., *Recent advances on plasmin inhibitors for the treatment of fibrinolysis-related disorders*. Medicinal research reviews, **2014**. 34(6): p. 1168-1216.
124. Henry, B. L., Abdel Aziz, M., Zhou, Q., and Desai, U. R., *Sulfated, low-molecular-weight lignins are potent inhibitors of plasmin, in addition to thrombin and factor Xa: Novel opportunity for controlling complex pathologies*. Thrombosis and haemostasis, **2010**. 103(3): p. 507-515.
125. Carpenter, S. L. and Mathew, P., *Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance*. Haemophilia, **2008**. 14(6): p. 1250-1254.
126. Lane, D. A., Philippou, H., and Huntington, J. A., *Directing thrombin*. Blood, **2005**. 106(8): p. 2605-2612.
127. Bode, W., Turk, D., and Karshikov, A., *The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships*. Protein Sci, **1992**. 1(4): p. 426-471.
128. Wells, C. M. and Di Cera, E., *Thrombin is a Na(+)-activated enzyme*. Biochemistry, **1992**. 31(47): p. 11721-11730.
129. Rana, S., Pozzi, N., Pelc, L. A., and Di Cera, E., *Redesigning allosteric activation in an enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2011**. 108(13): p. 5221-5225.

130. Tanaka, K. A., Key, N. S., and Levy, J. H., *Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation*. *Anesth Analg*, **2009**. 108(5): p. 1433-1446.
131. Lwaleed, B. A. and Bass, P. S., *Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease*. *J Pathol*, **2006**. 208(3): p. 327-339.
132. Dahlbäck, B. and Villoutreix, B. O., *The anticoagulant protein C pathway*. *FEBS Letters*, **2005**. 579(15): p. 3310-3316.
133. Mast, A. E., *Tissue Factor Pathway Inhibitor: Multiple Anticoagulant Activities for a Single Protein*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **2016**. 36(1): p. 9-14.
134. Stassen, J. M., Arnout, J., and Deckmyn, H., *The hemostatic system*. *Current medicinal chemistry*, **2004**. 11(17): p. 2245-2260.
135. Collins, B. and Hollidge, C., *Antithrombotic drug market*. *Nature reviews. Drug discovery*, **2003**. 2(1): p. 11-12.
136. Harter, K., Levine, M., and Henderson, S. O., *Anticoagulation Drug Therapy: A Review*. *Western Journal of Emergency Medicine*, **2015**. 16(1): p. 11-17.
137. Baroletti, S. A. and Goldhaber, S. Z., *Heparin-induced thrombocytopenia*. *Circulation*, **2006**. 114(8): p. e355-356.
138. Warkentin, T. E., *Heparin-induced thrombocytopenia: diagnosis and management*. *Circulation*, **2004**. 110(18): p. e454-458.
139. Ahmed, I., Majeed, A., and Powell, R., *Heparin induced thrombocytopenia: diagnosis and management update*. *Postgraduate Medical Journal*, **2007**. 83(983): p. 575-582.
140. Markwardt, F., *Isolation and chemical characterization of hirudin*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, **1957**. 308(2-4): p. 147-156.
141. Markwardt, F., *Hirudin as alternative anticoagulant--a historical review*. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, **2002**. 28(5): p. 405-414.
142. Markwardt, F., *The development of hirudin as an antithrombotic drug*. *Thrombosis Research*, **1994**. 74(1): p. 1-23.

143. Maraganore, J. M., Bourdon, P., Jablonski, J., Ramachandran, K. L., and Fenton, J. W., 2nd, *Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin*. Biochemistry, **1990**. 29(30): p. 7095-7101.
144. Warkentin, T. E. and Koster, A., *Bivalirudin: a review*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, **2005**. 6(8): p. 1349-1371.
145. Bajusz, S., Barabas, E., Tolnay, P., Szell, E., and Bagdy, D., *Inhibition of thrombin and trypsin by tripeptide aldehydes*. Int J Pept Protein Res, **1978**. 12(4): p. 217-221.
146. Kettner, C. and Shaw, E., *D-Phe-Pro-ArgCH₂Cl-A selective affinity label for thrombin*. Thromb Res, **1979**. 14(6): p. 969-973.
147. Steinmetzer, T. and Stürzebecher, J., *Progress in the development of synthetic thrombin inhibitors as new orally active anticoagulants*. Current medicinal chemistry, **2004**. 11(17): p. 2297-2321.
148. Schwienhorst, A., *Direct thrombin inhibitors - a survey of recent developments*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, **2006**. 63(23): p. 2773-2791.
149. Kranjc, A. and Kikelj, D., *Dual inhibitors of the blood coagulation enzymes*. Current medicinal chemistry, **2004**. 11(19): p. 2535-2547.
150. Steinmetzer, T., Hauptmann, J., and Stürzebecher, J., *Advances in the development of thrombin inhibitors*. Expert opinion on investigational drugs, **2001**. 10(5): p. 845-864.
151. Steinmetzer, T., Baum, B., Biela, A., Klebe, G., Nowak, G., and Bucha, E., *Beyond Heparinization: Design of Highly Potent Thrombin Inhibitors Suitable for Surface Coupling*. ChemMedChem, **2012**. 7(11): p. 1965-1973.
152. Gustafsson, D., Bylund, R., Antonsson, T., Nilsson, I., Nystrom, J. E., Eriksson, U., Bredberg, U., and Teger-Nilsson, A. C., *A new oral anticoagulant: the 50-year challenge*. Nature reviews. Drug discovery, **2004**. 3(8): p. 649-659.
153. Yeh, C. H., Hogg, K., and Weitz, J. I., *Overview of the new oral anticoagulants: opportunities and challenges*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, **2015**. 35(5): p. 1056-1065.

154. Pollack, C. V., Jr., Reilly, P. A., Eikelboom, J., Glund, S., Verhamme, P., Bernstein, R. A., Dubiel, R., Huisman, M. V., Hylek, E. M., Kamphuisen, P. W., Kreuzer, J., Levy, J. H., Sellke, F. W., Stangier, J., Steiner, T., Wang, B., Kam, C. W., and Weitz, J. I., *Idarucizumab for Dabigatran Reversal*. The New England journal of medicine, **2015**. 373(6): p. 511-520.
155. Lu, G., DeGuzman, F. R., Hollenbach, S. J., Karbarz, M. J., Abe, K., Lee, G., Luan, P., Hutchaleelaha, A., Inagaki, M., Conley, P. B., Phillips, D. R., and Sinha, U., *A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa*. Nature medicine, **2013**. 19(4): p. 446-451.
156. Fenger-Eriksen, C., Münster, A. M., and Grove, E. L., *New oral anticoagulants: clinical indications, monitoring and treatment of acute bleeding complications*. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, **2014**. 58(6): p. 651-659.
157. Schweinitz, A., Steinmetzer, T., Banke, I. J., Arlt, M. J., Stürzebecher, A., Schuster, O., Geissler, A., Giersiefen, H., Zeslawska, E., Jacob, U., Krüger, A., and Stürzebecher, J., *Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents*. The Journal of biological chemistry, **2004**. 279(32): p. 33613-33622.
158. Hauptmann, J., Steinmetzer, T., Vieweg, H., Wikström, P., and Stürzebecher, J., *Influence of structural variations in peptidomimetic 4-amidinophenylalanine-derived thrombin inhibitors on plasma clearance and biliary excretion in rats*. Pharm Res, **2002**. 19(7): p. 1027-1033.
159. Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Künzel, S., Wikström, P., Hauptmann, J., and Stürzebecher, J., *Structure-activity relationships of new NAPAP-analogs*. J Enzyme Inhib, **2001**. 16(3): p. 241-249.
160. Stürzebecher, J., Prasa, D., Hauptmann, J., Vieweg, H., and Wikström, P., *Synthesis and structure-activity relationships of potent thrombin inhibitors: piperazides of 3-amidinophenylalanine*. J Med Chem, **1997**. 40(19): p. 3091-3099.
161. Ghibellini, G., Leslie, E. M., and Brouwer, K. L. R., *Methods To Evaluate Biliary Excretion of Drugs in Humans: An Updated Review*. Molecular Pharmaceutics, **2006**. 3(3): p. 198-211.

162. Endreas, W., Brüßler, J., Vornicescu, D., Keusgen, M., Bakowsky, U., and Steinmetzer, T., *Thrombin-Inhibiting Anticoagulant Liposomes: Development and Characterization*. ChemMedChem, **2016**. 11(3): p. 340-349.
163. Steinmetzer, T., Baum, B., Biela, A., Klebe, G., Nowak, G., and Bucha, E., *Beyond heparinization: design of highly potent thrombin inhibitors suitable for surface coupling*. ChemMedChem, **2012**. 7(11): p. 1965-1973.
164. Johnson, T. B. and Ambler, J. A., Researches on amines. IV.1 the alkylation and hydrolysis of aliphatic sulfonamides. A new synthesis of sarcosine. 2. Journal of the American Chemical Society, **1914**. 36(2): p. 372-385.
165. Schwarz, G., Alberts, H., and Kricheldorf, H. R., *Syntheses and reactions of (trimethylsiloxy)benzoyl chlorides*. Liebigs Annalen der Chemie, **1981**. 1981(7): p. 1257-1270.
166. Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Dönnecke, D., Uhland, K., Schuster, O., Steinmetzer, P., Müller, F., Friedrich, R., Than, M. E., Bode, W., and Stürzebecher, J., *Secondary Amides of Sulfonylated 3-Amidinophenylalanine. New Potent and Selective Inhibitors of Matrilysin*. Journal of Medicinal Chemistry, **2006**. 49(14): p. 4116-4126.
167. De Bont, D. B. A. D., Gerard D. H.; Den Hartog, Jack A. J.; Liskamp, Rob M. J., Solid-phase synthesis of peptidosulfonamide containing peptides derived from leu-enkephalin I. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **1996**. 6(24): p. 3035-3040.
168. Marchand-Brynaert, J., Bouchet, M., Touillaux, R., Beauve, C., and Fastrez, J., *Design and synthesis of a bifunctional label for selection of β -lactamase displayed on filamentous bacteriophage by catalytic activity*. Tetrahedron, **1996**. 52(15): p. 5591-5606.
169. Becker, G. L., Lu, Y., Harges, K., Strehlow, B., Levesque, C., Lindberg, I., Sandvig, K., Bakowsky, U., Day, R., Garten, W., and Steinmetzer, T., *Highly potent inhibitors of proprotein convertase furin as potential drugs for treatment of infectious diseases*. J Biol Chem, **2012**. 287(26): p. 21992-22003.

170. Choi, J. K., Ho, J., Curry, S., Qin, D., Bittman, R., and Hamilton, J. A., *Interactions of very long-chain saturated fatty acids with serum albumin*. J Lipid Res, **2002**. 43(7): p. 1000-1010.
171. Peterson, G. E., *Intermediate and long-acting insulins: a review of NPH insulin, insulin glargine and insulin detemir*. Curr Med Res Opin, **2006**. 22(12): p. 2613-2619.
172. Dockal, M., Carter, D. C., and Ruker, F., *The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties*. J Biol Chem, **1999**. 274(41): p. 29303-29310.
173. Curry, S., Mandelkow, H., Brick, P., and Franks, N., *Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites*. Nature structural biology, **1998**. 5(9): p. 827-835.
174. Oida, T., *¹H-NMR study on the interactions of human serum albumin with free fatty acid*. Journal of biochemistry, **1986**. 100(6): p. 1533-1542.
175. Spector, A. A., *Fatty acid binding to plasma albumin*. J Lipid Res, **1975**. 16(3): p. 165-179.
176. Künzel, S., Schweinitz, A., Reissmann, S., Stürzebecher, J., and Steinmetzer, T., *4-amidinobenzylamine-based inhibitors of urokinase*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, **2002**. 12(4): p. 645-648.
177. Stürzebecher, A., Dönnecke, D., Schweinitz, A., Schuster, O., Steinmetzer, P., Stürzebecher, U., Kotthaus, J., Clement, B., Stürzebecher, J., and Steinmetzer, T., *Highly potent and selective substrate analogue factor Xa inhibitors containing D-homophenylalanine analogues as P3 residue: part 2*. ChemMedChem, **2007**. 2(7): p. 1043-1053.
178. Kadono, S., Sakamoto, A., Kikuchi, Y., Oh-Eda, M., Yabuta, N., Yoshihashi, K., Kitazawa, T., Suzuki, T., Koga, T., Hattori, K., Shiraishi, T., Haramura, M., Kodama, H., Ono, Y., Esaki, T., Sato, H., Watanabe, Y., Itoh, S., Ohta, M., and Kozono, T., *Structure-based design of P3 moieties in the peptide mimetic factor VIIa inhibitor*. Biochemical and biophysical research communications, **2005**. 327(2): p. 589-596.

179. Anabousi, S., Laue, M., Lehr, C.-M., Bakowsky, U., and Ehrhardt, C., *Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V, **2005**. 60(2): p. 295-303.
180. Bakowsky, H., Richter, T., Kneuer, C., Hoekstra, D., Rothe, U., Bendas, G., Ehrhardt, C., and Bakowsky, U., *Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery*. Biochim Biophys Acta, **2008**. 1778(1): p. 242-249.
181. Olson, S. T., Swanson, R., and Petitou, M., *Specificity and selectivity profile of EP217609: a new neutralizable dual-action anticoagulant that targets thrombin and factor Xa*. Blood, **2012**. 119(10): p. 2187-2195.
182. Guo, X., *Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review*. Journal of Biophotonics, **2012**. 5(7): p. 483-501.
183. Olaru, A., Bala, C., Jaffrezic-Renault, N., and Aboul-Enein, H. Y., *Surface plasmon resonance (SPR) biosensors in pharmaceutical analysis*. Critical reviews in analytical chemistry / CRC, **2015**. 45(2): p. 97-105.
184. Dassinger, N., Vornicescu, D., Merkl, S., Kehrel, M., Dayyoub, E., Bakowsky, U., and Keusgen, M., *A fusion protein for regenerative surfaces*. physica status solidi (a), **2012**. 209(5): p. 832-838.
185. Dennis, S., Wallace, A., Hofsteenge, J., and Stone, S. R., *Use of fragments of hirudin to investigate thrombin-hirudin interaction*. European journal of biochemistry / FEBS, **1990**. 188(1): p. 61-66.
186. Der Voort, P. V. and Vansant, E. F., *Silylation of the Silica Surface A Review*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **1996**. 19(17-18): p. 2723-2752.
187. McCormick, D. B. and Roth, J. A., *Specificity, stereochemistry, and mechanism of the color reaction between p-dimethylaminocinnamaldehyde and biotin analogs*. Analytical Biochemistry, **1970**. 34(1): p. 226-236.

188. Zempleni, J., McCormick, D. B., and Mock, D. M., *Identification of biotin sulfone, bisnorbiotin methyl ketone, and tetranorbiotin-l-sulfoxide in human urine*. Am J Clin Nutr, **1997**. 65(2): p. 508-511.
189. Walsmann, P., *On the purification of thrombin preparations*. Die Pharmazie, **1968**. 23(7): p. 401-402.
190. Dixon, M., *The determination of enzyme inhibitor constants*. Biochemical Journal, **1953**. 55(1): p. 170-171.
191. Ukraincik, K. and Piknosh, W., *Microprocessor-based radioimmunoassay data analysis*. Methods in enzymology, **1981**. 74 Pt C: p. 497-508.
192. Anabousi, S., Laue, M., Lehr, C.-M., Bakowsky, U., and Ehrhardt, C., *Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **2005**. 60(2): p. 295-303.
193. Marxer, E. E., Brüssler, J., Becker, A., Schummelfeder, J., Schubert, R., Nimsky, C., and Bakowsky, U., *Development and characterization of new nanoscaled ultrasound active lipid dispersions as contrast agents*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V, **2011**. 77(3): p. 430-437.
194. Sitterberg, J., Ozcetin, A., Ehrhardt, C., and Bakowsky, U., *Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V, **2010**. 74(1): p. 2-13.
195. Kasemo, B. and Lausmaa, J., *Biomaterial and implant surfaces: On the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures*. Journal of Biomedical Materials Research, **1988**. 22(S13): p. 145-158.
196. Shirai, K., Yoshida, Y., Nakayama, Y., Fujitani, M., Shintani, H., Wakasa, K., Okazaki, M., Snauwaert, J., and Van Meerbeek, B., *Assessment of decontamination methods as pretreatment of silanization of composite glass fillers*. J Biomed Mater Res, **2000**. 53(3): p. 204-210.

-
197. Cras, J. J., Rowe-Taitt, C. A., Nivens, D. A., and Ligler, F. S., *Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization*. Biosensors and Bioelectronics, **1999**. 14(8–9): p. 683-688.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Endreas, W., Brüssler J., Vornicescu D., Keusgen M., Bakowsky U., Steinmetzer T.,
Thrombin-Inhibiting Anticoagulant Liposomes: Development and Characterization.
ChemMedChem, **2016**, 11, 340-349

Posterbeiträge:

1. DPhG Jahrestagung, Frankfurt am Main; September 2014.

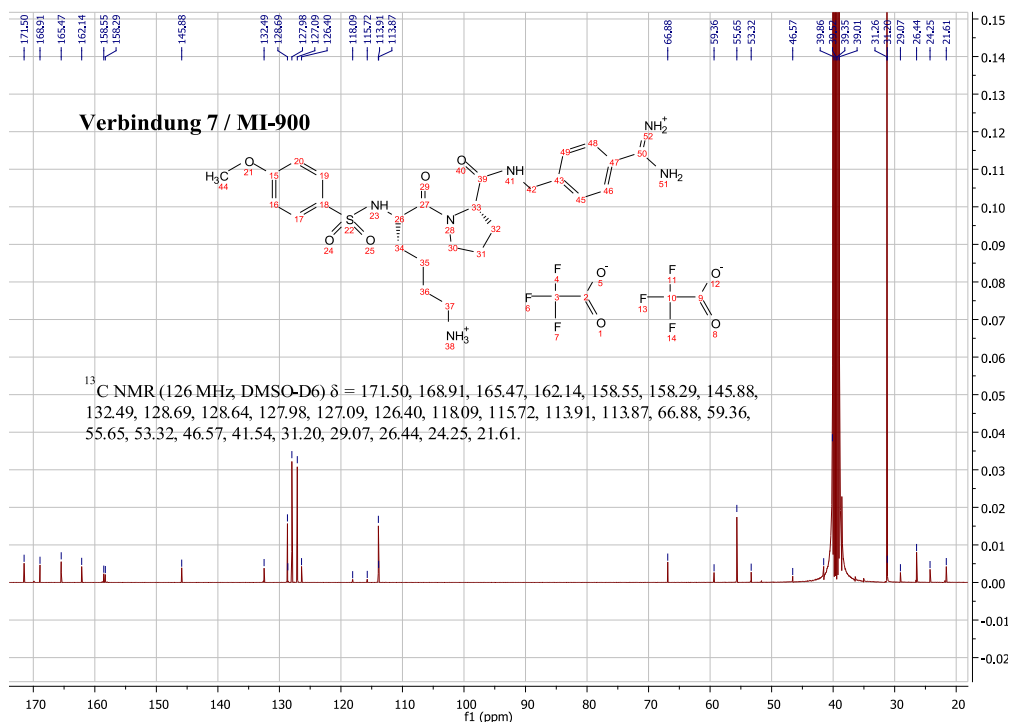
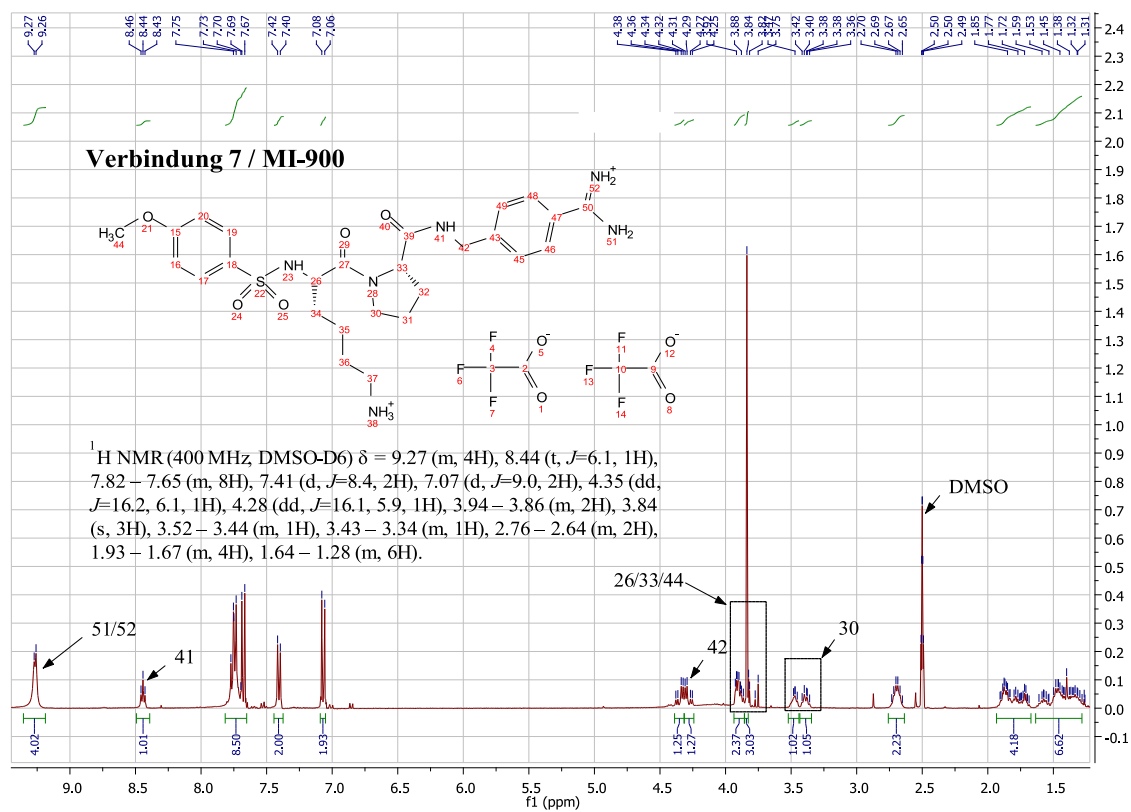
***Titel:** “Synthesis and characterization of liposome-bound thrombin inhibitors”*

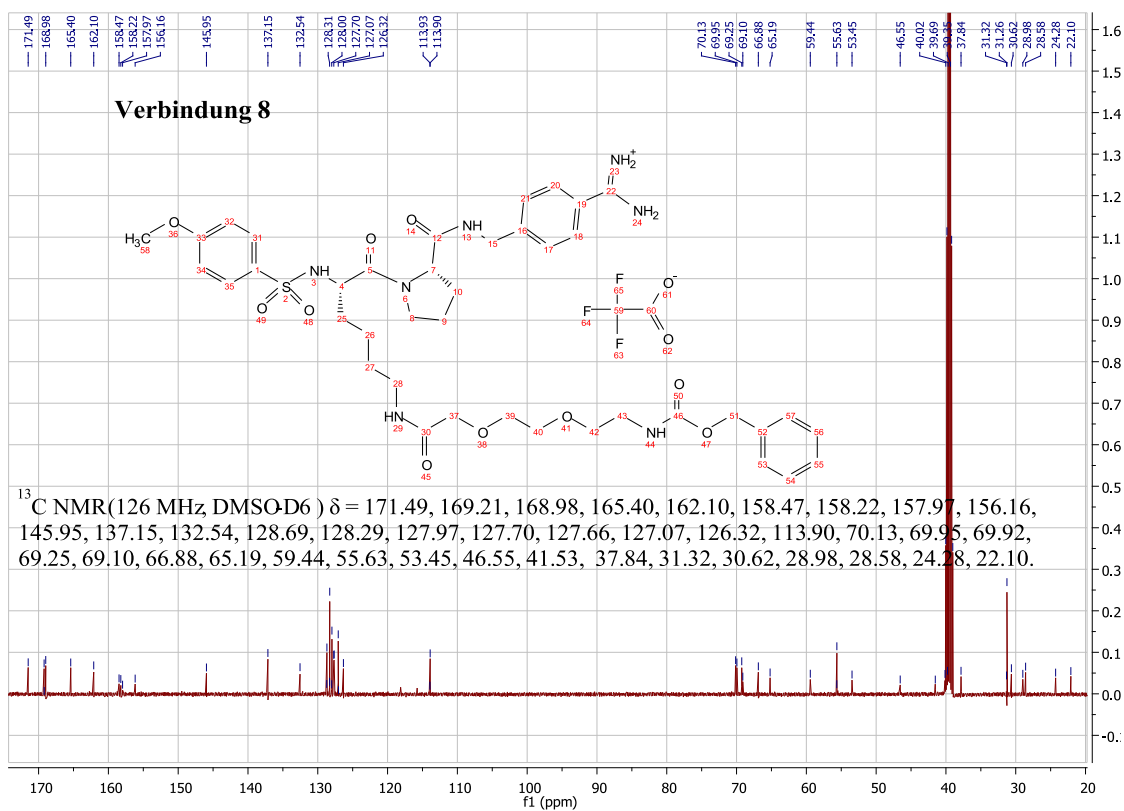
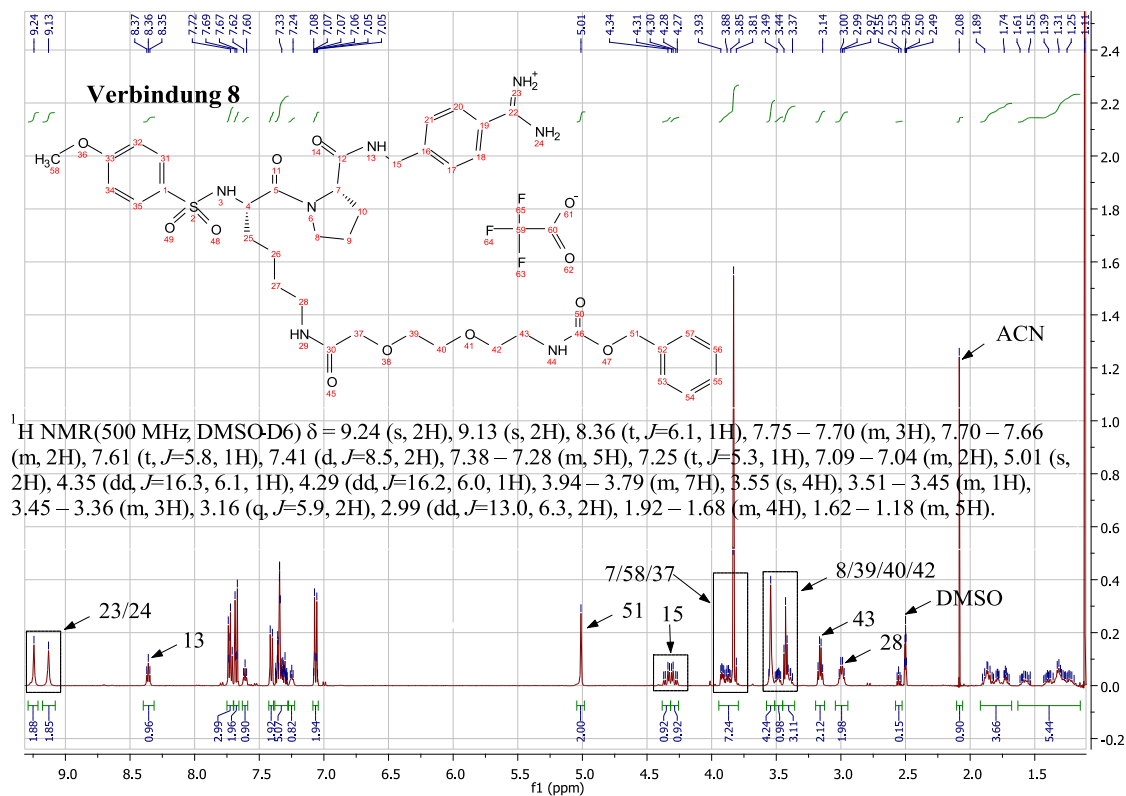
2. Frontiers in Medicinal Chemistry, Marburg; März 2015.

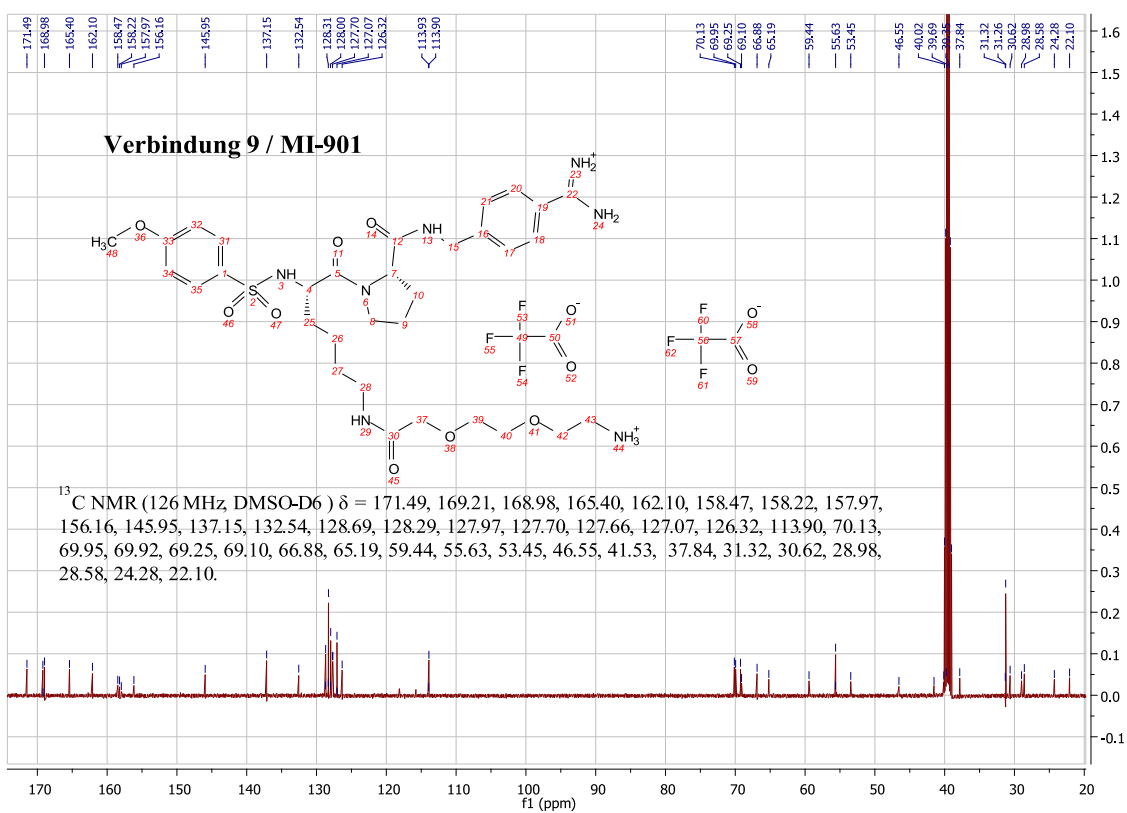
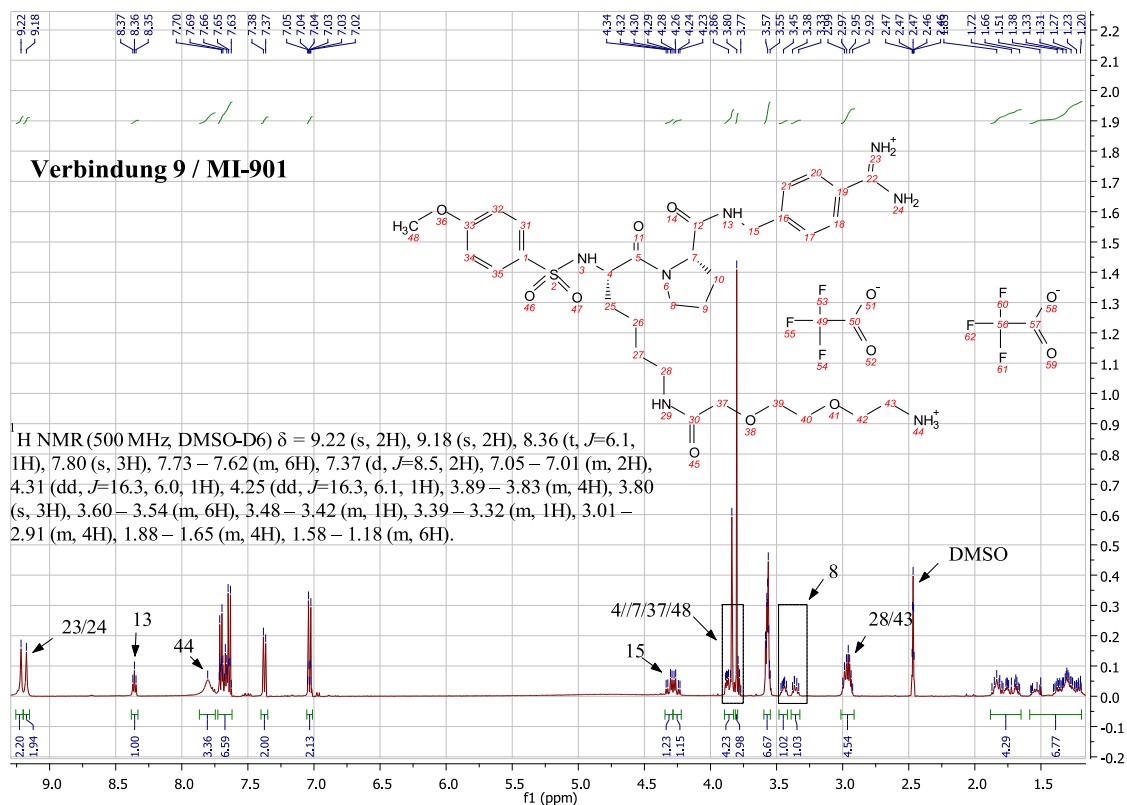
***Titel:** “Synthesis and characterization of liposome-bound thrombin inhibitors”*

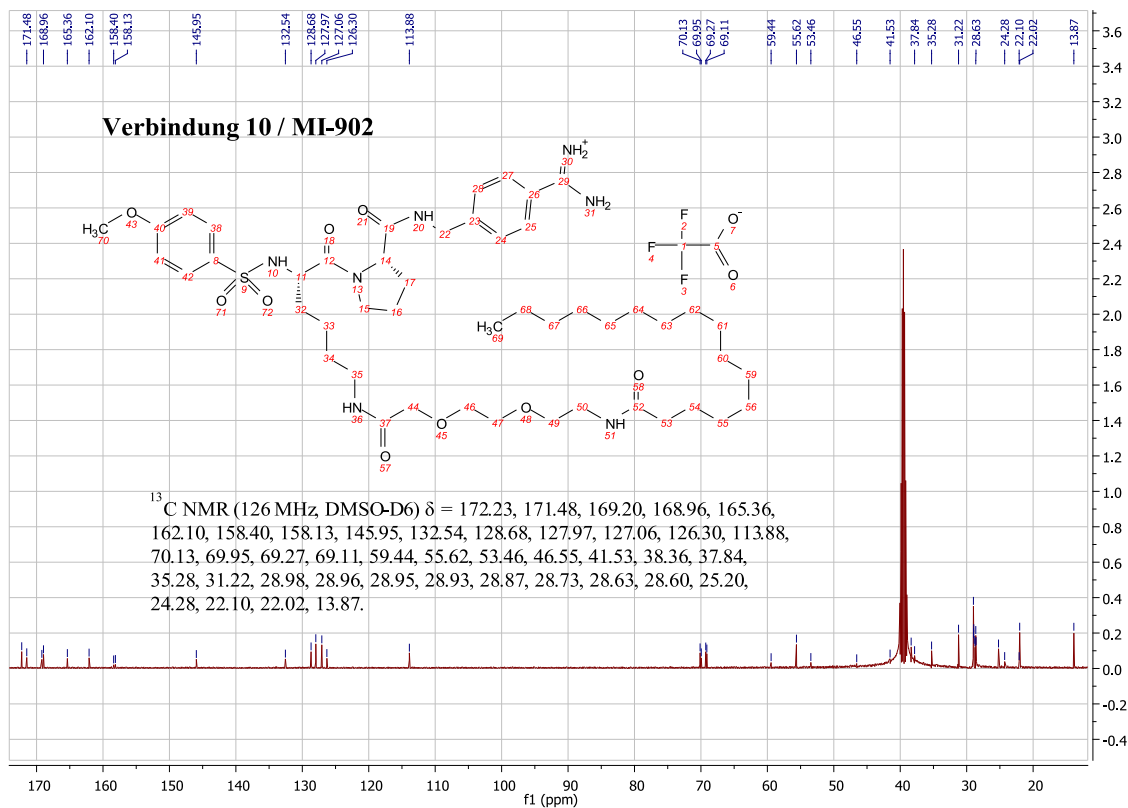
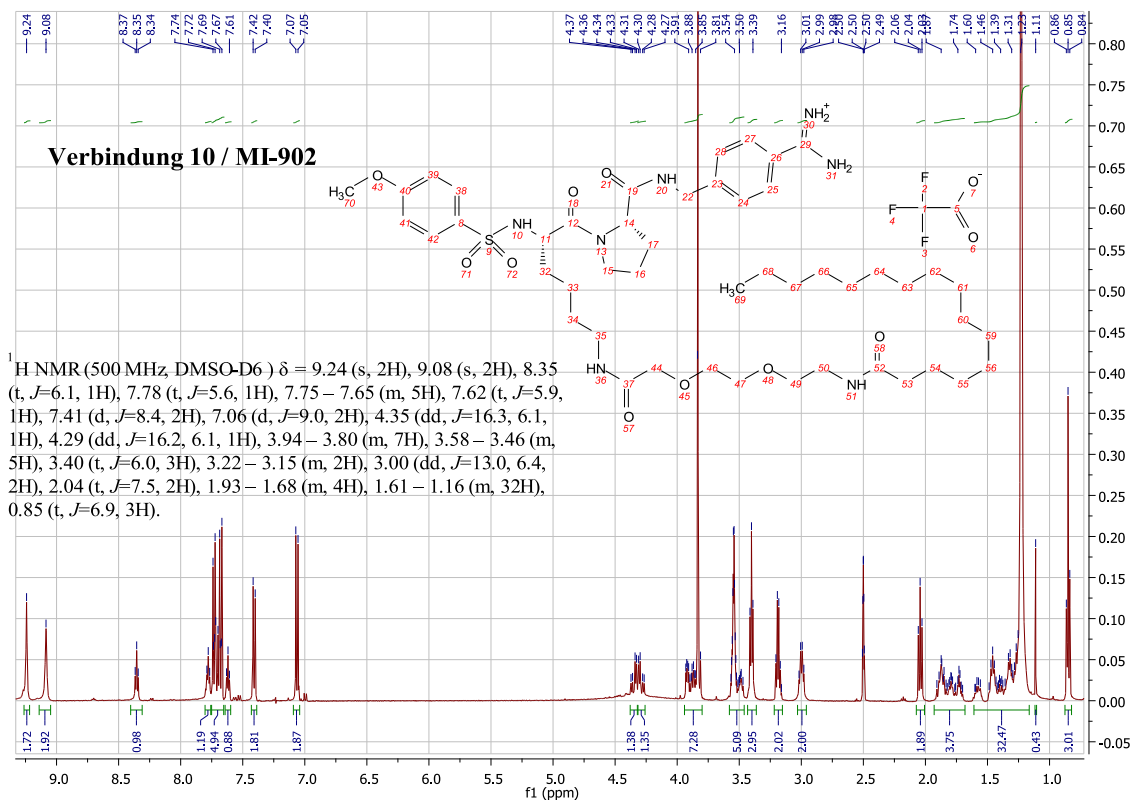
Anhang

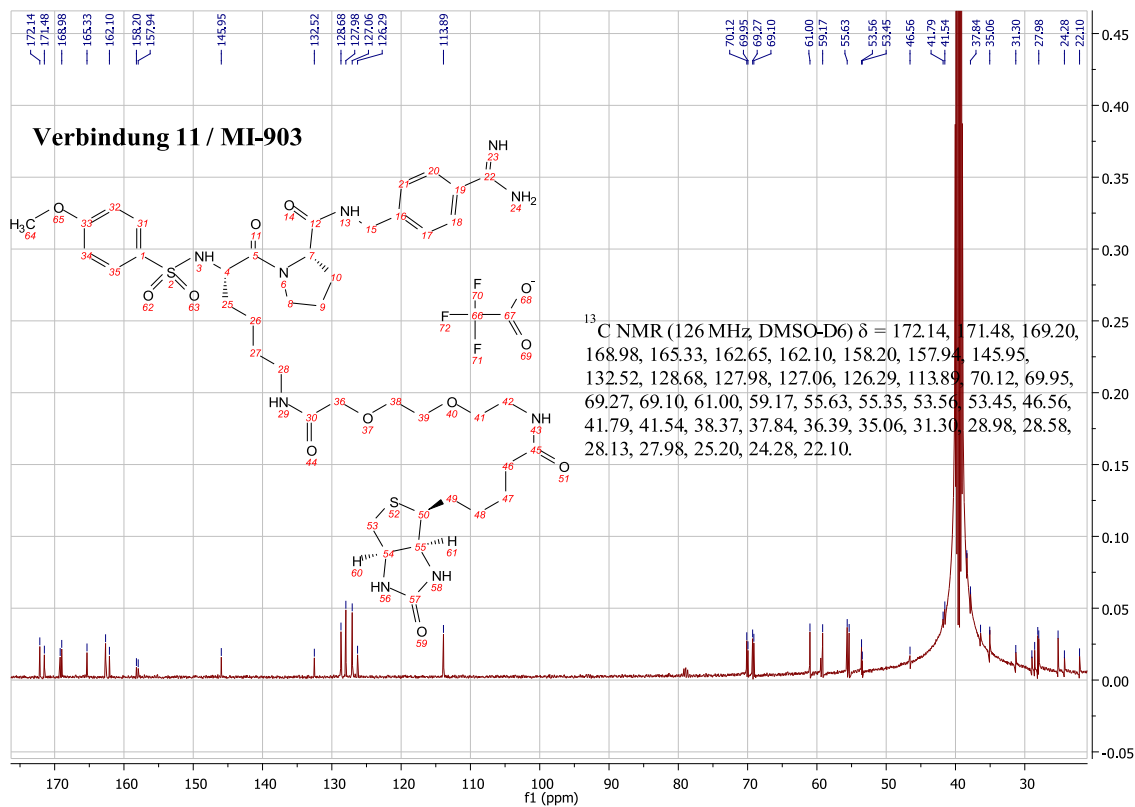
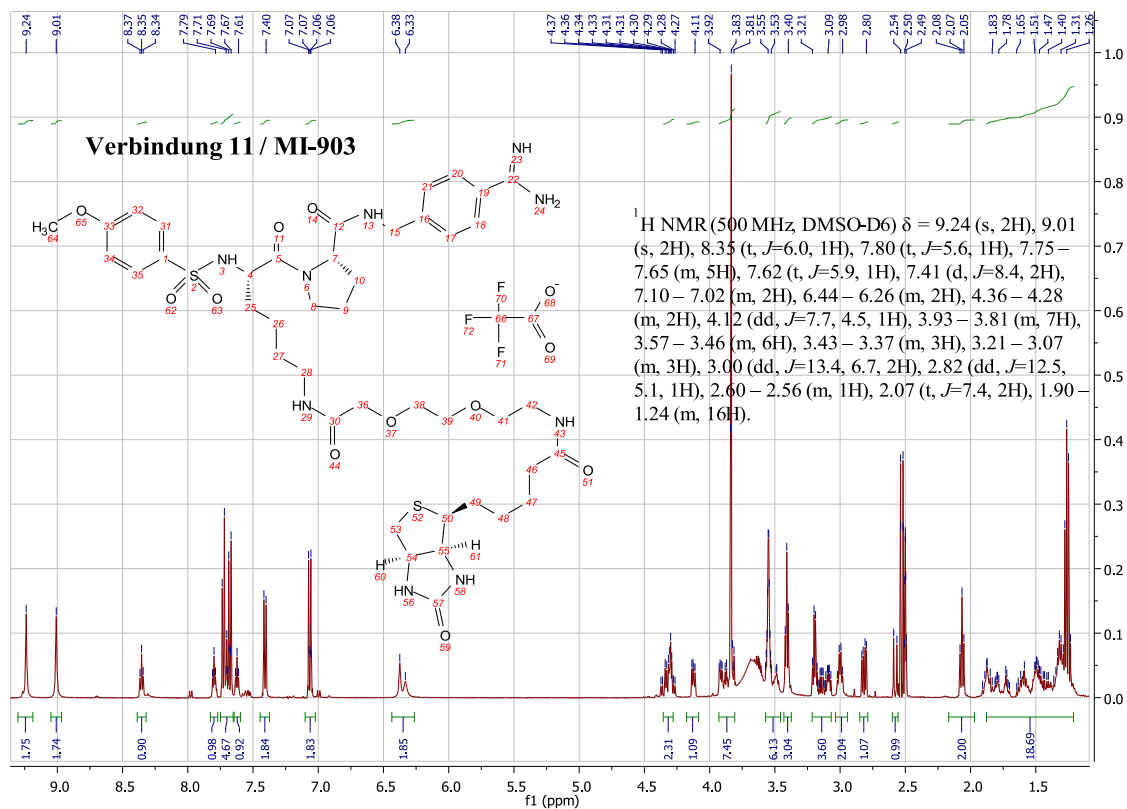
NMR-Spektren

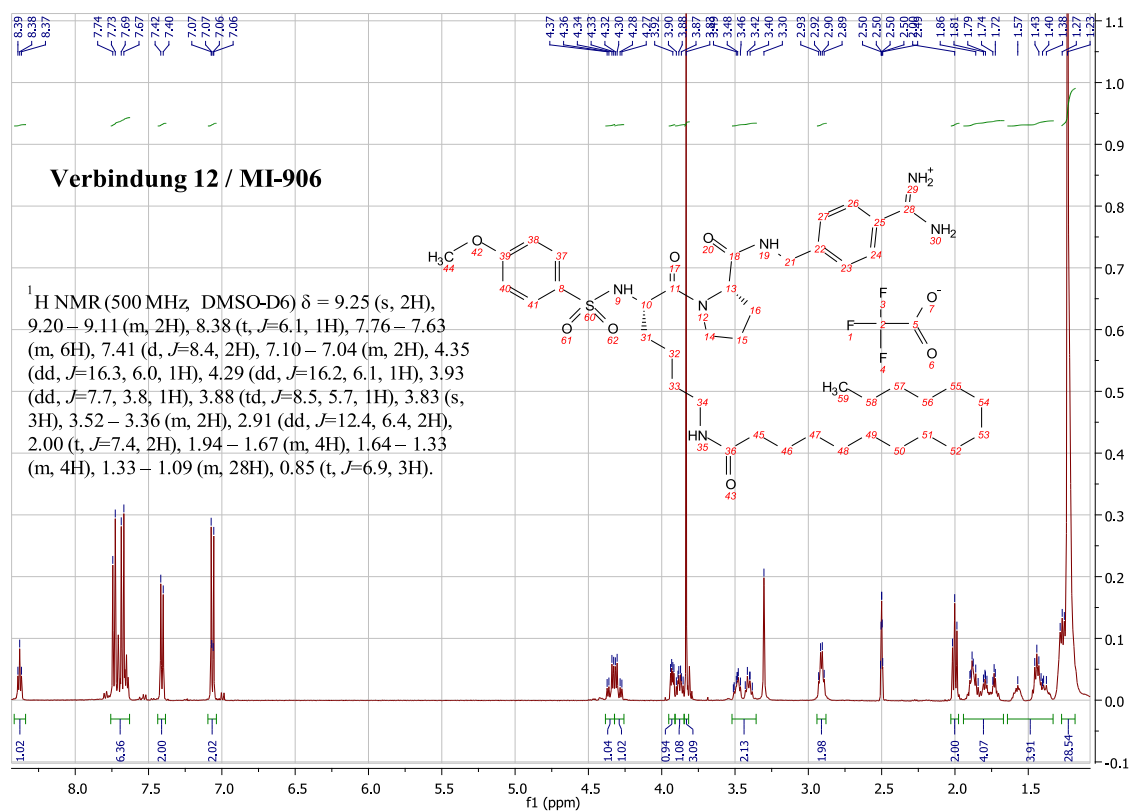


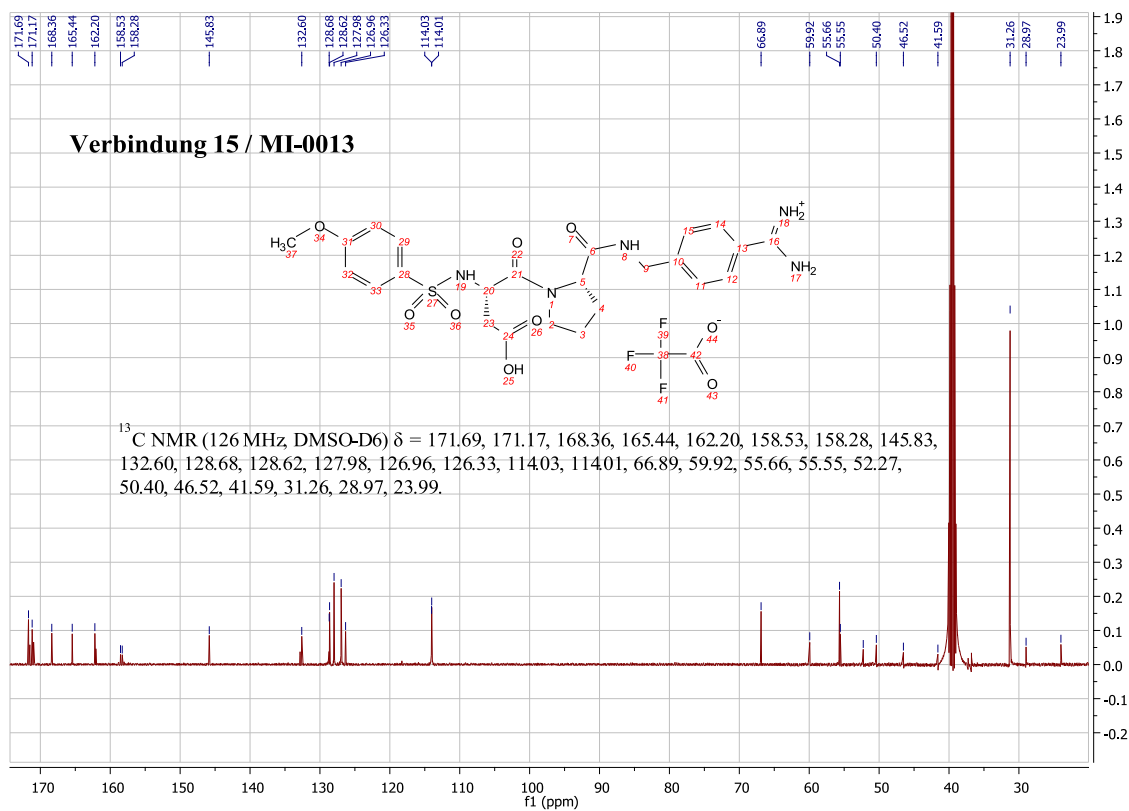
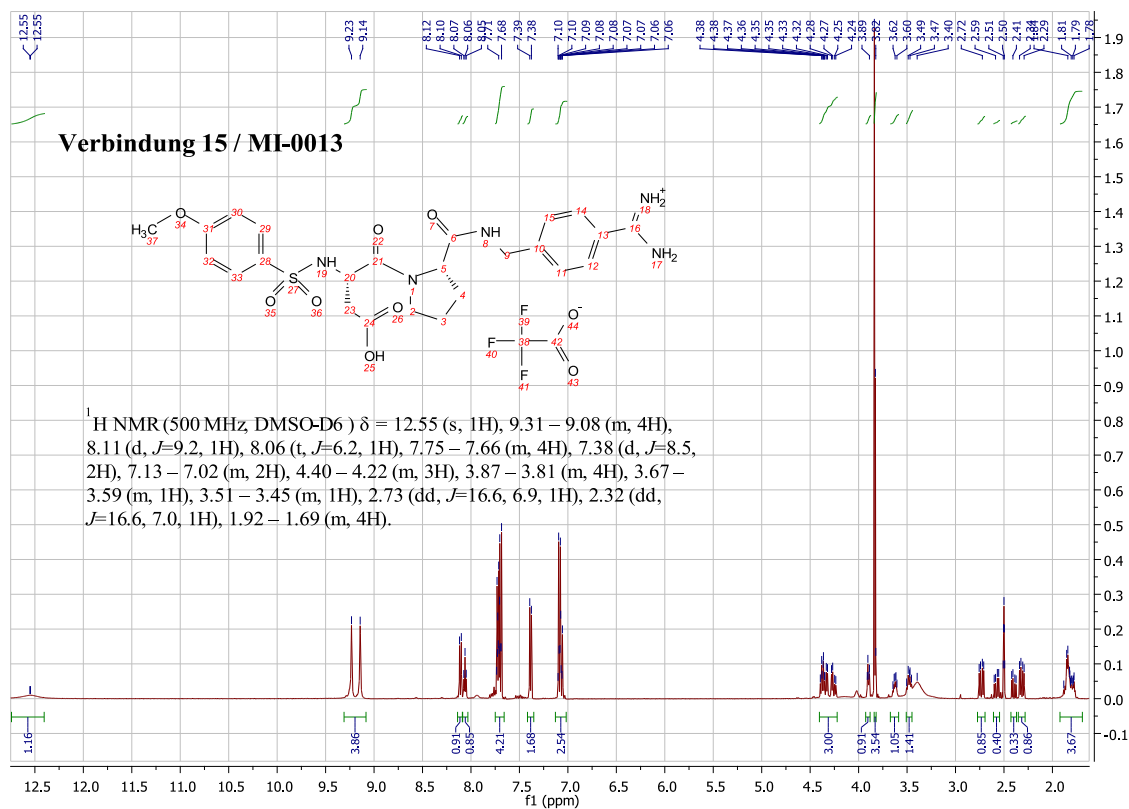


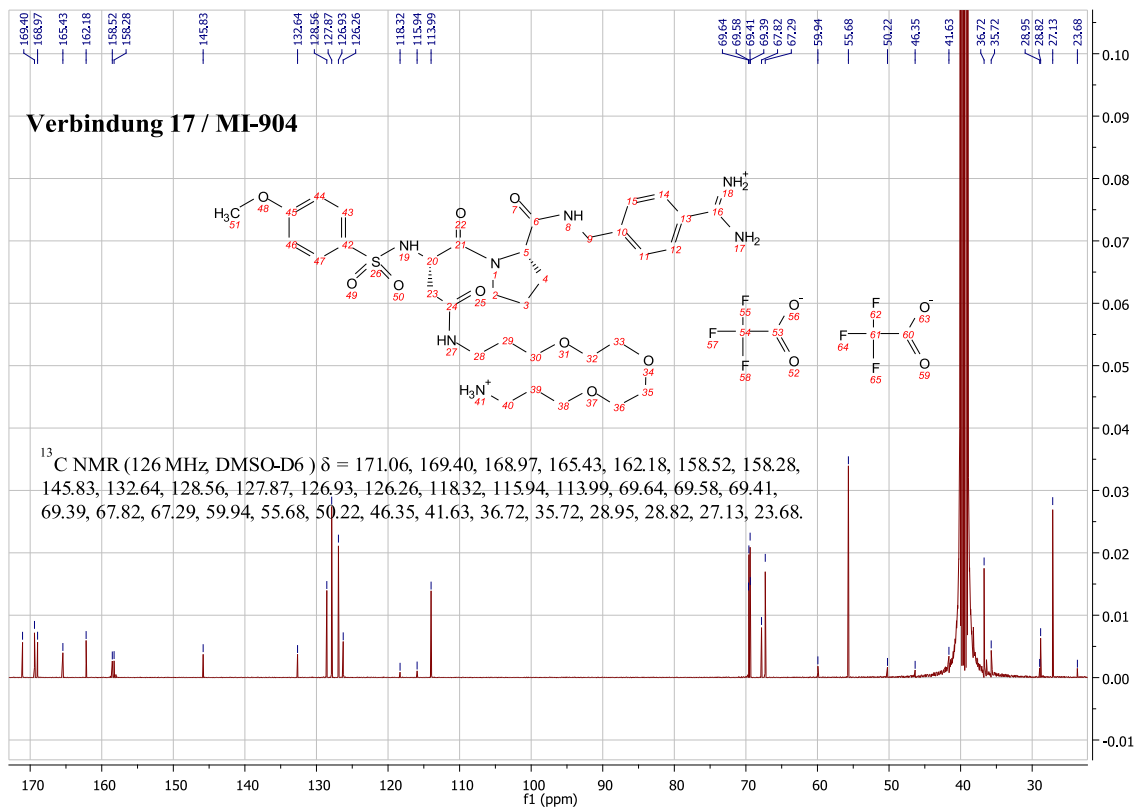
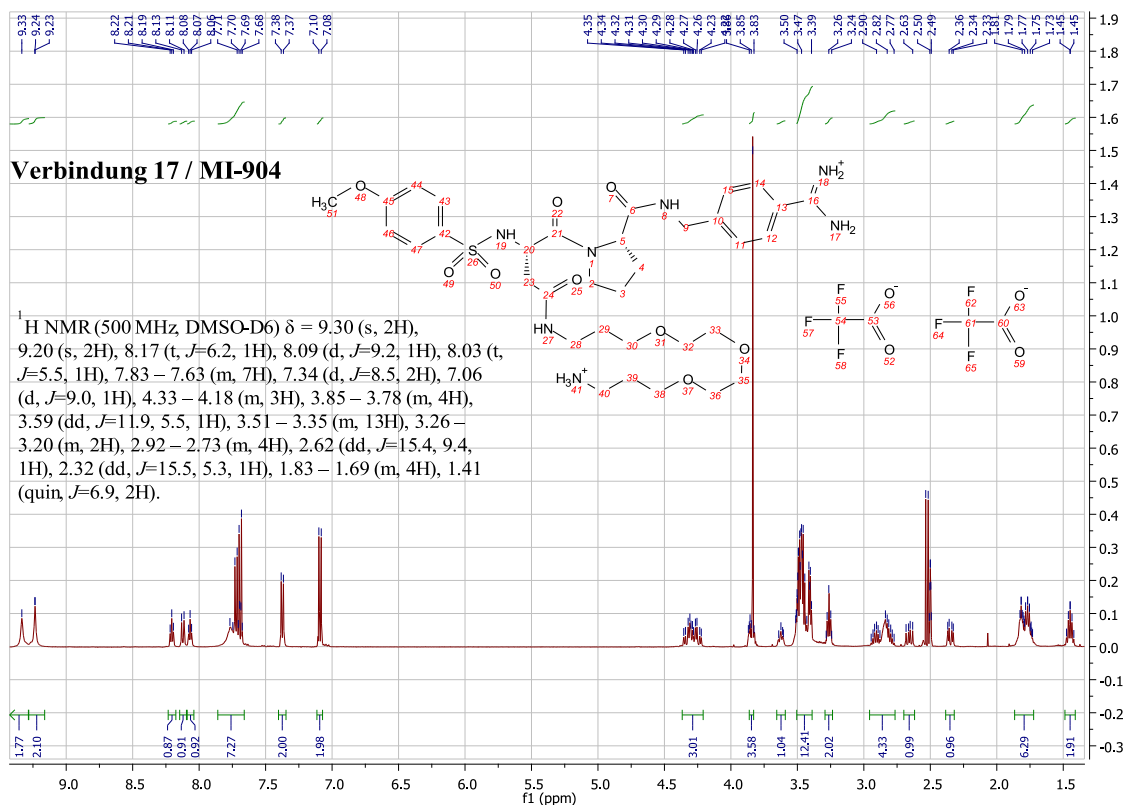


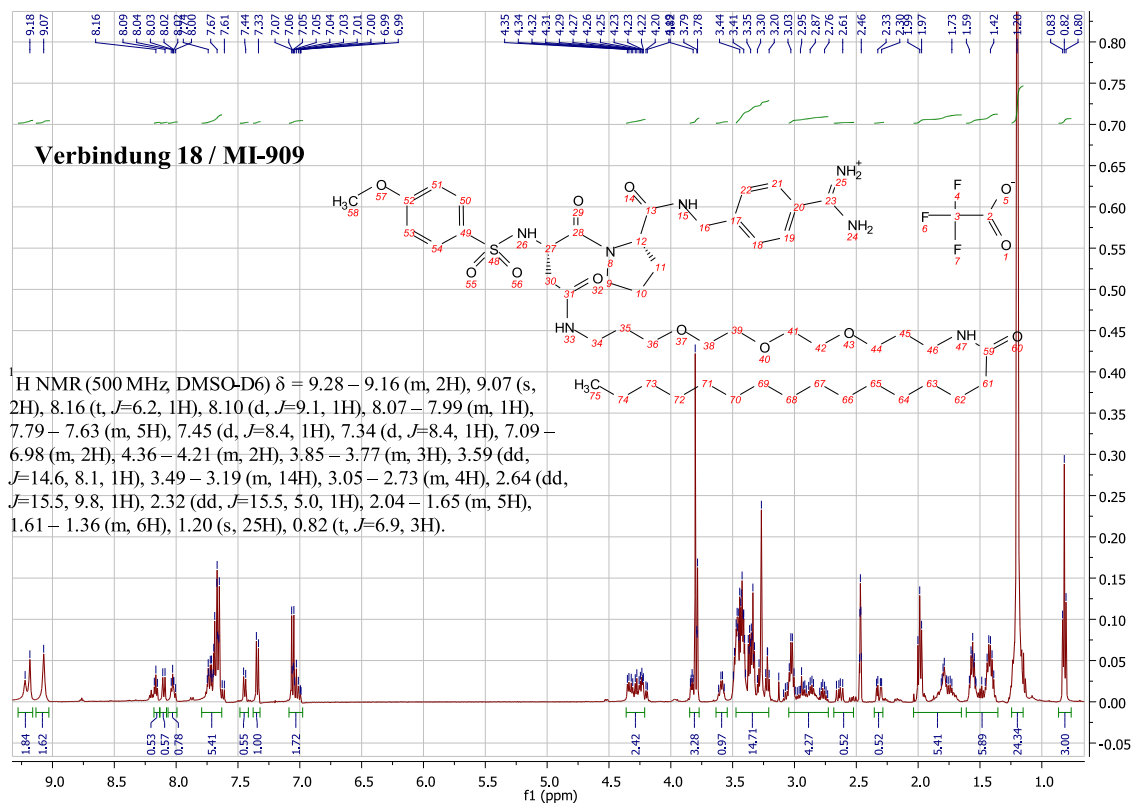


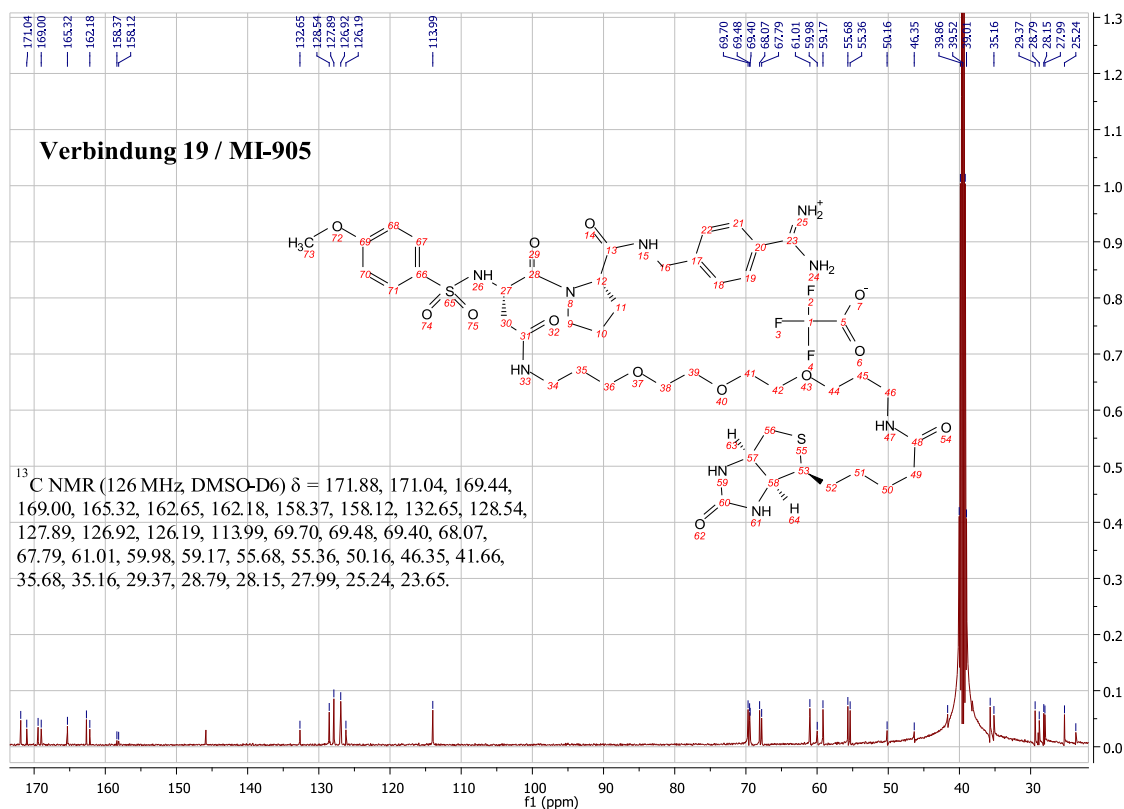
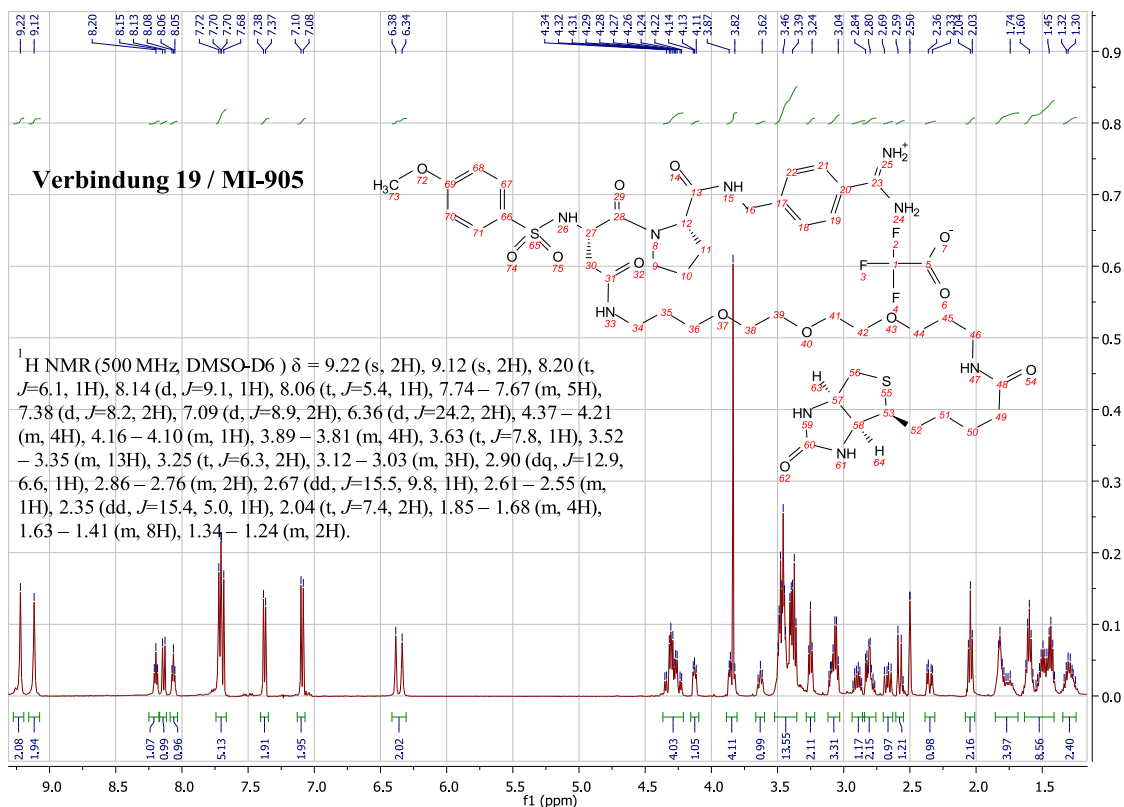


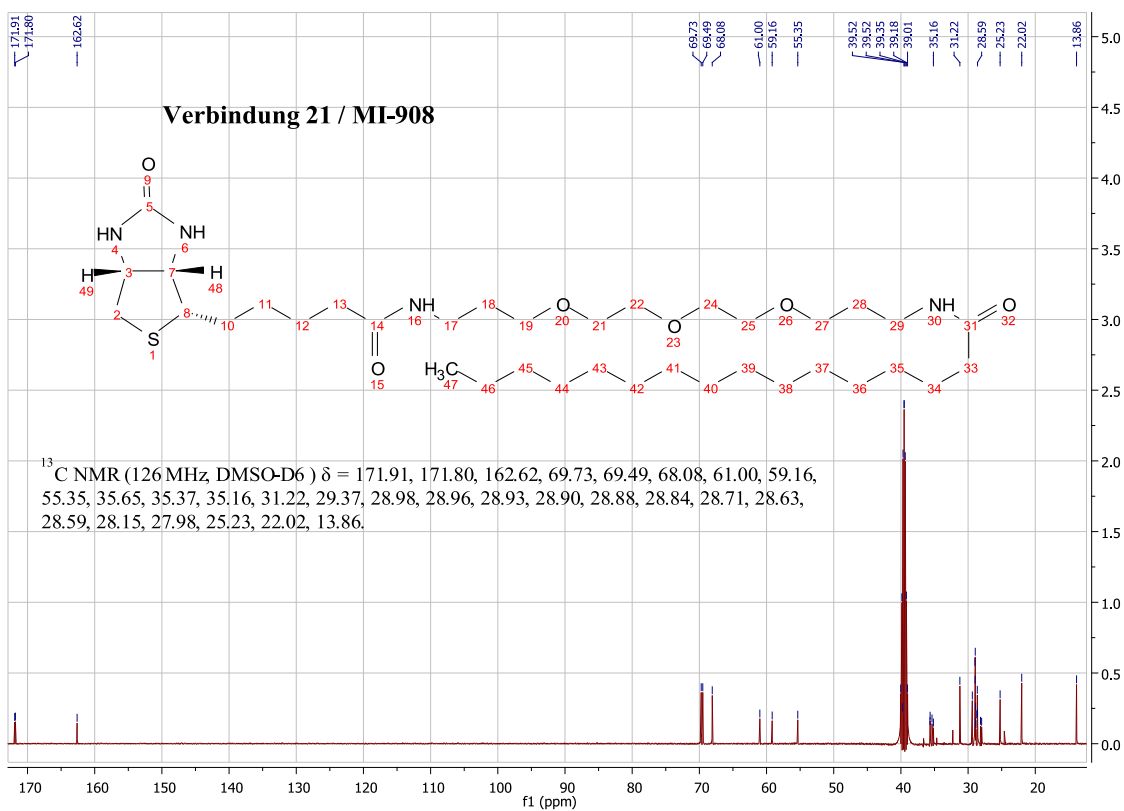
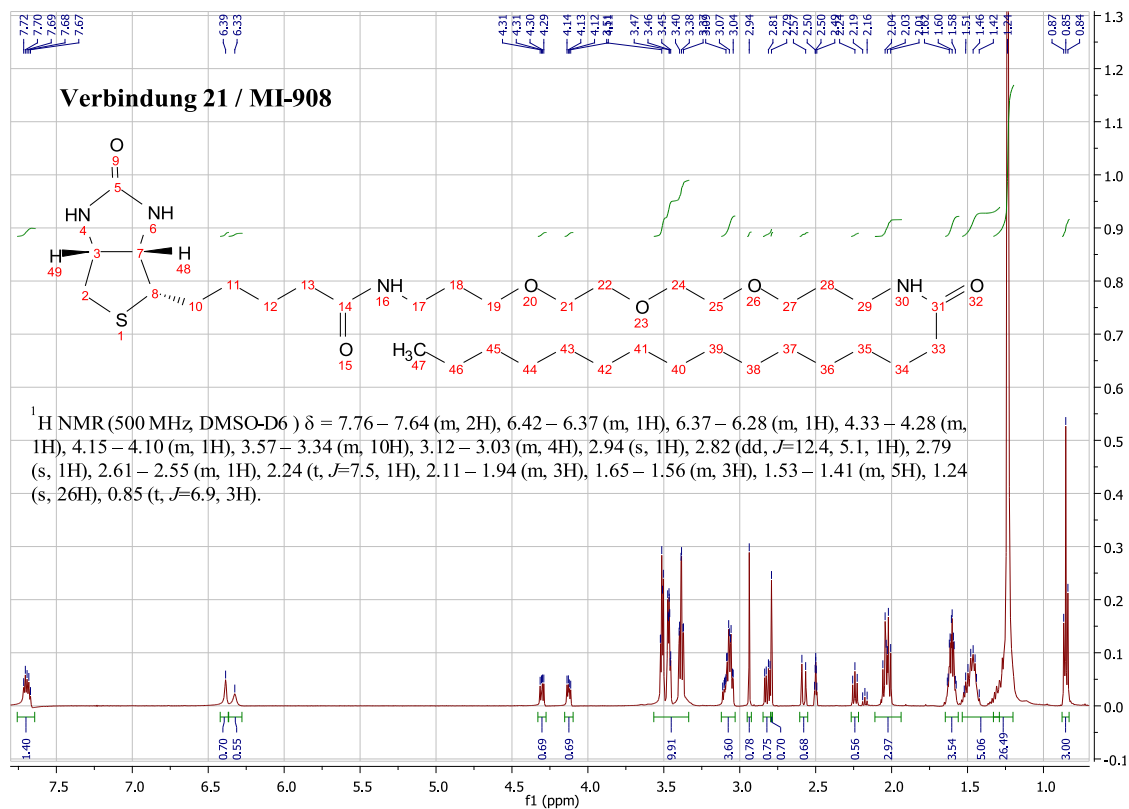


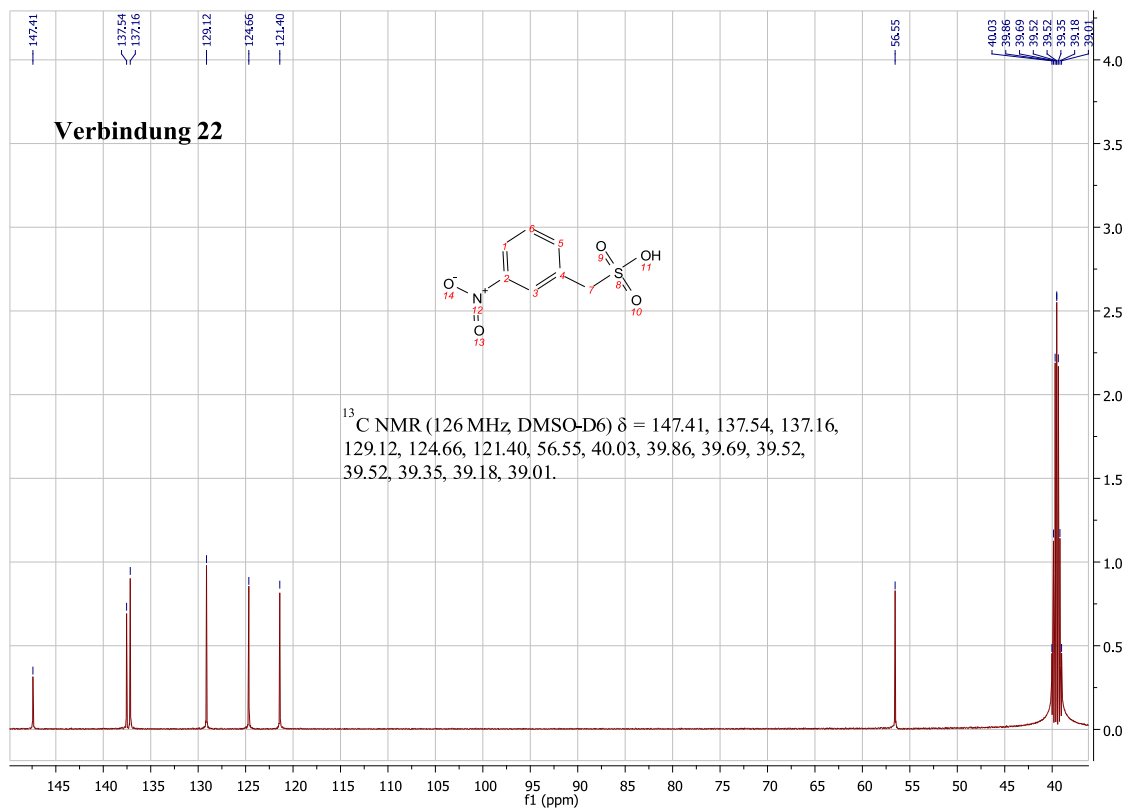
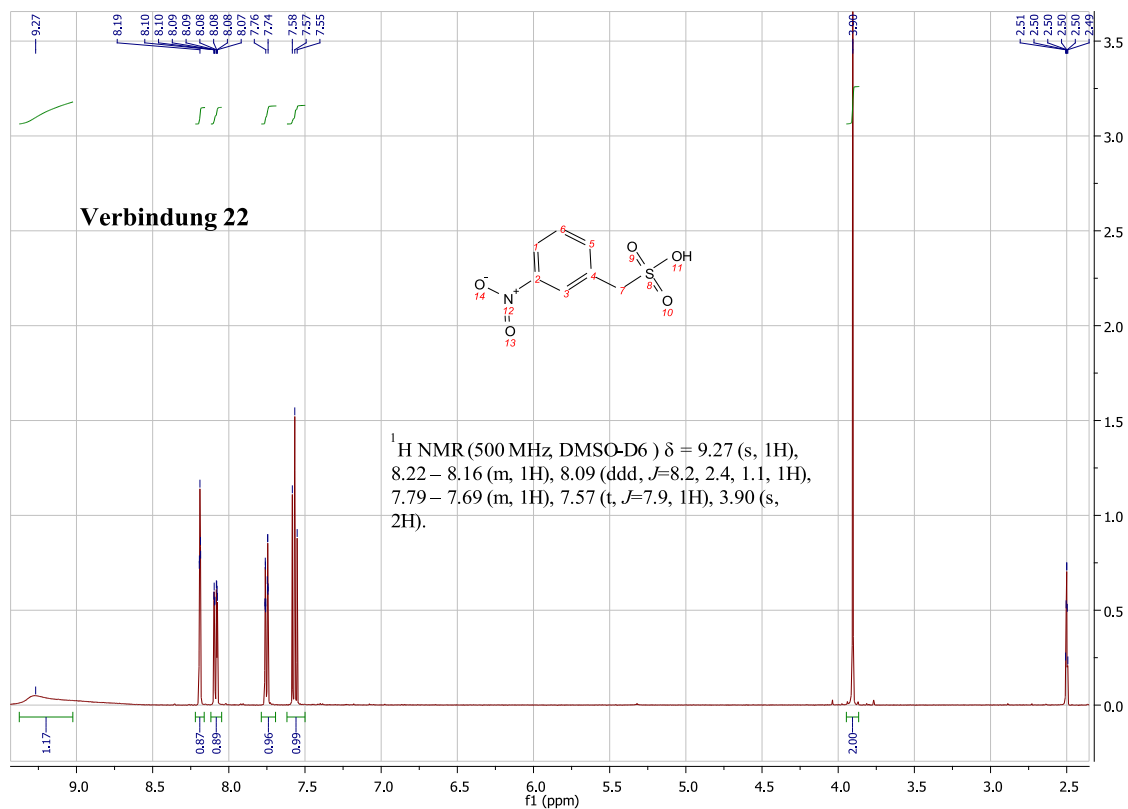


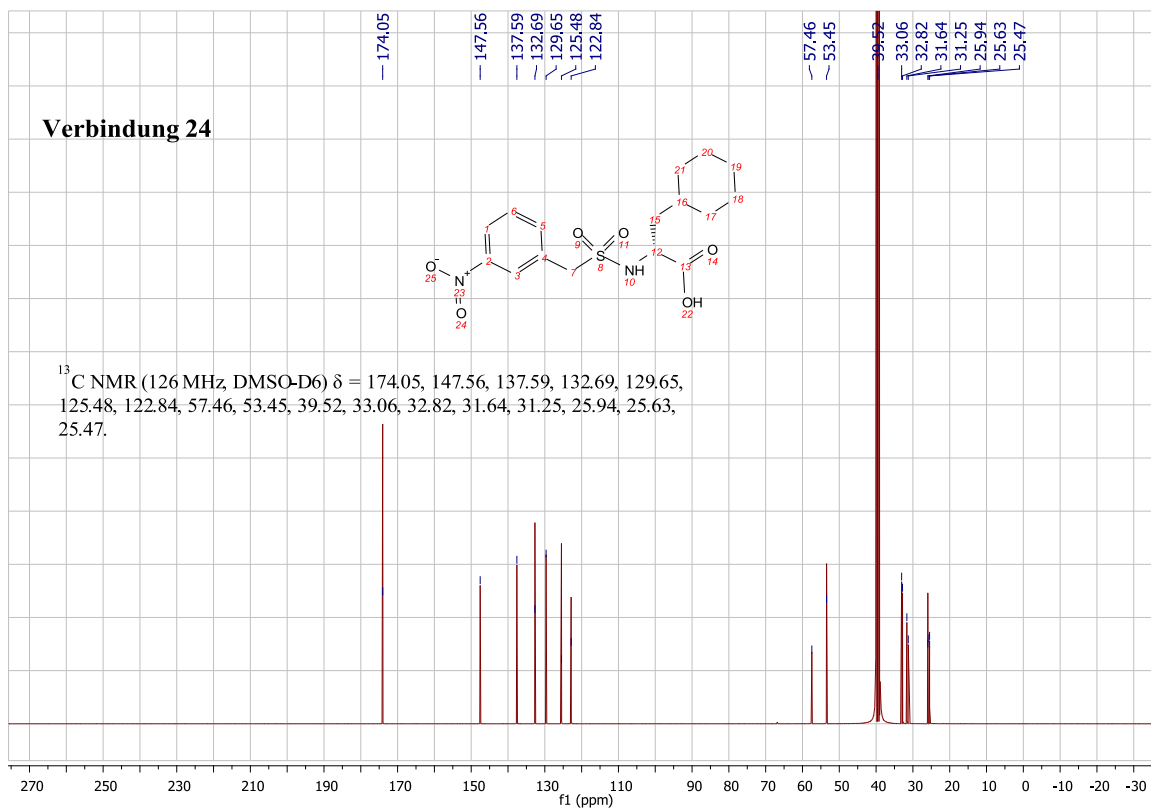
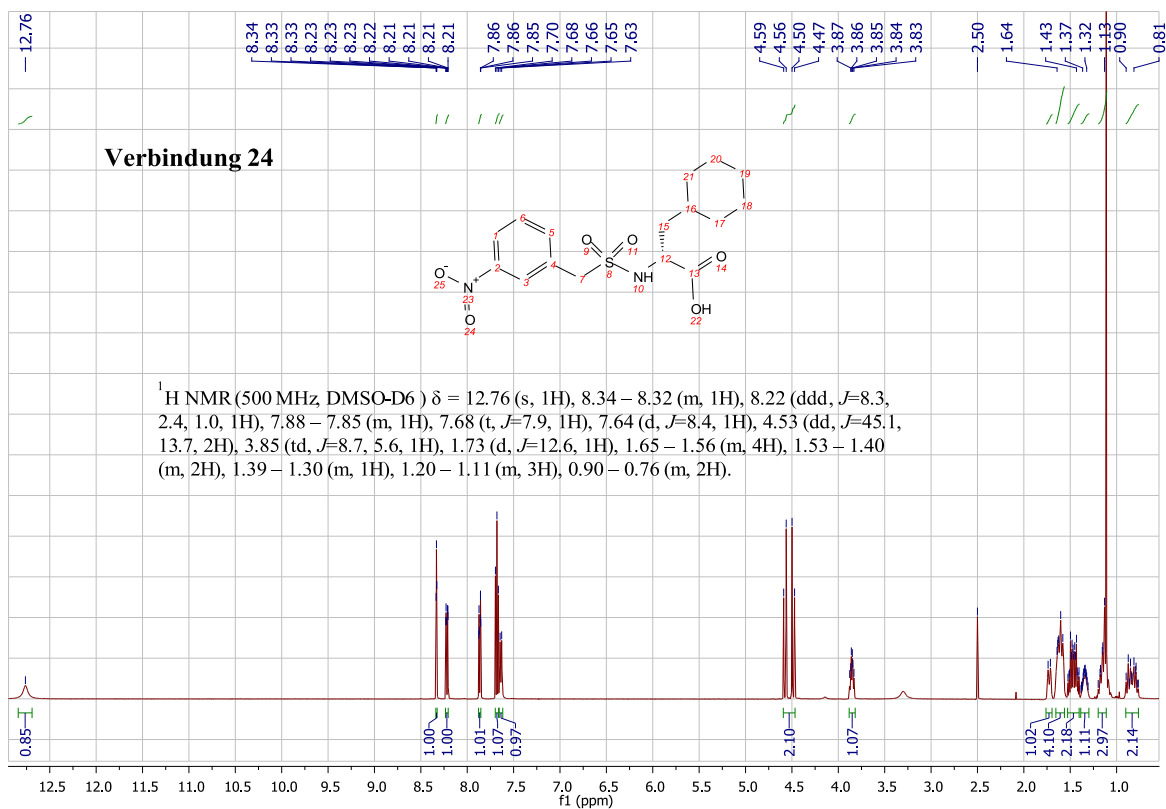


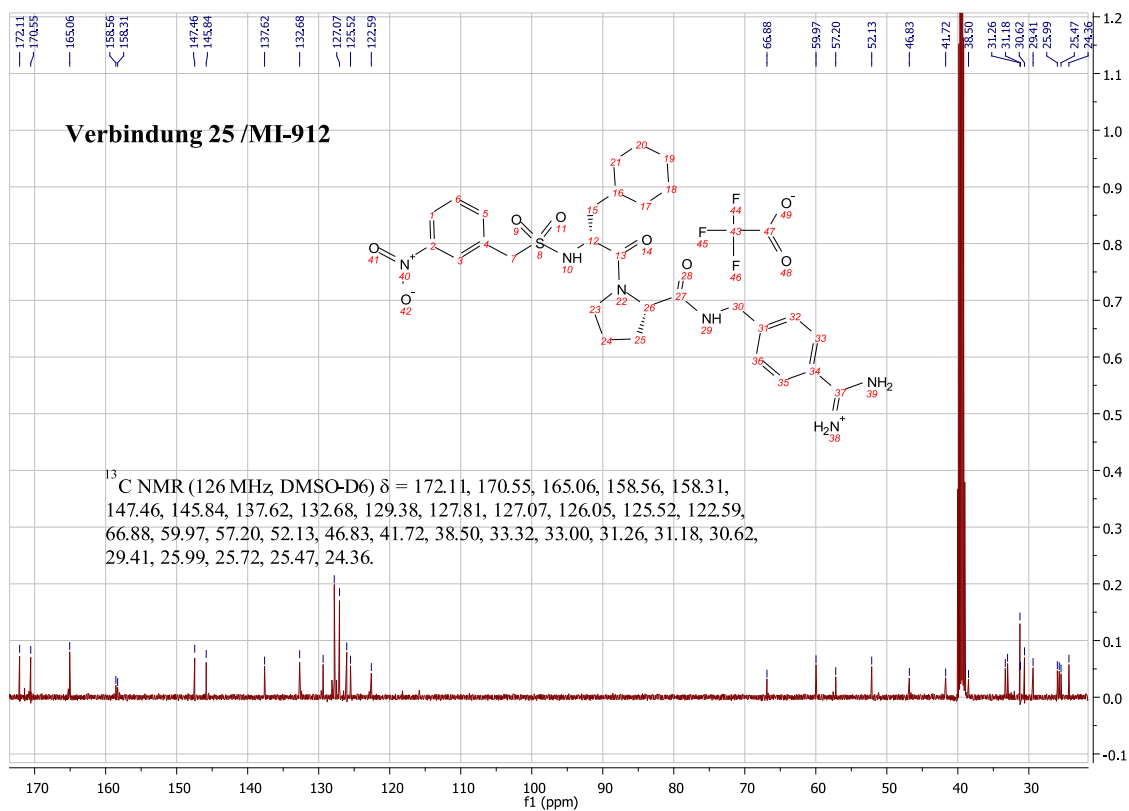
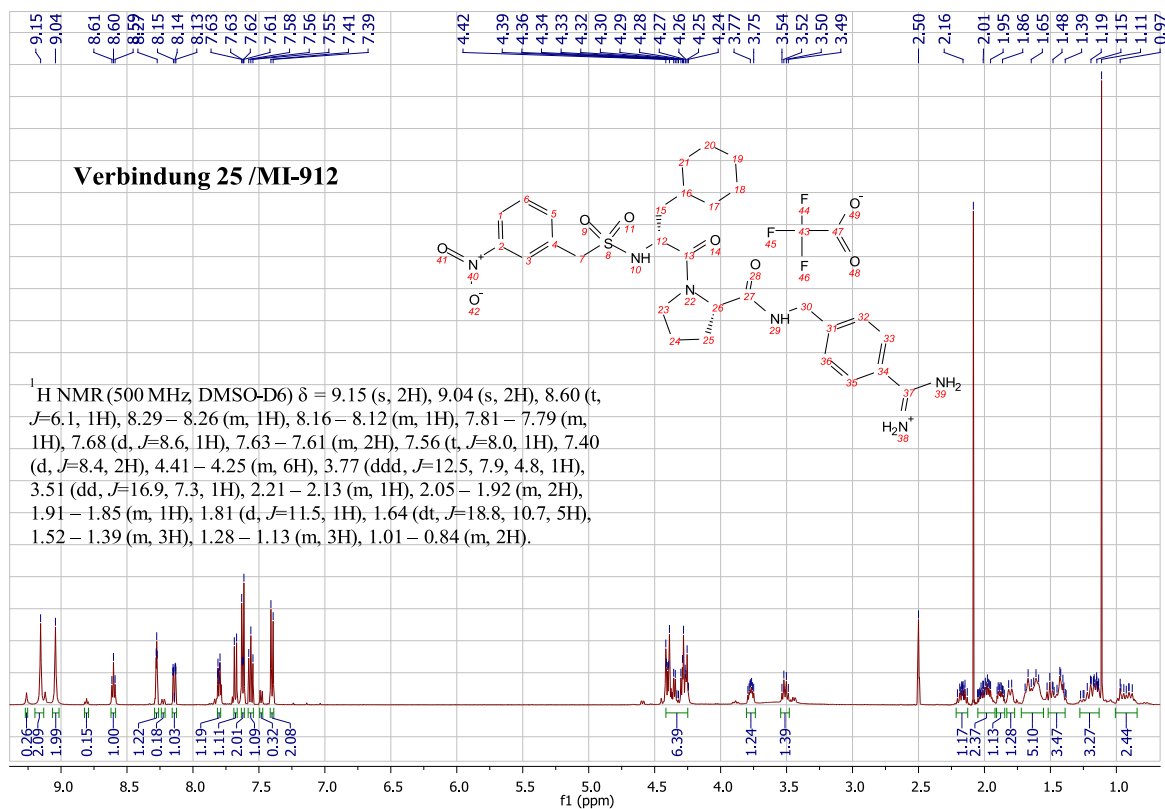


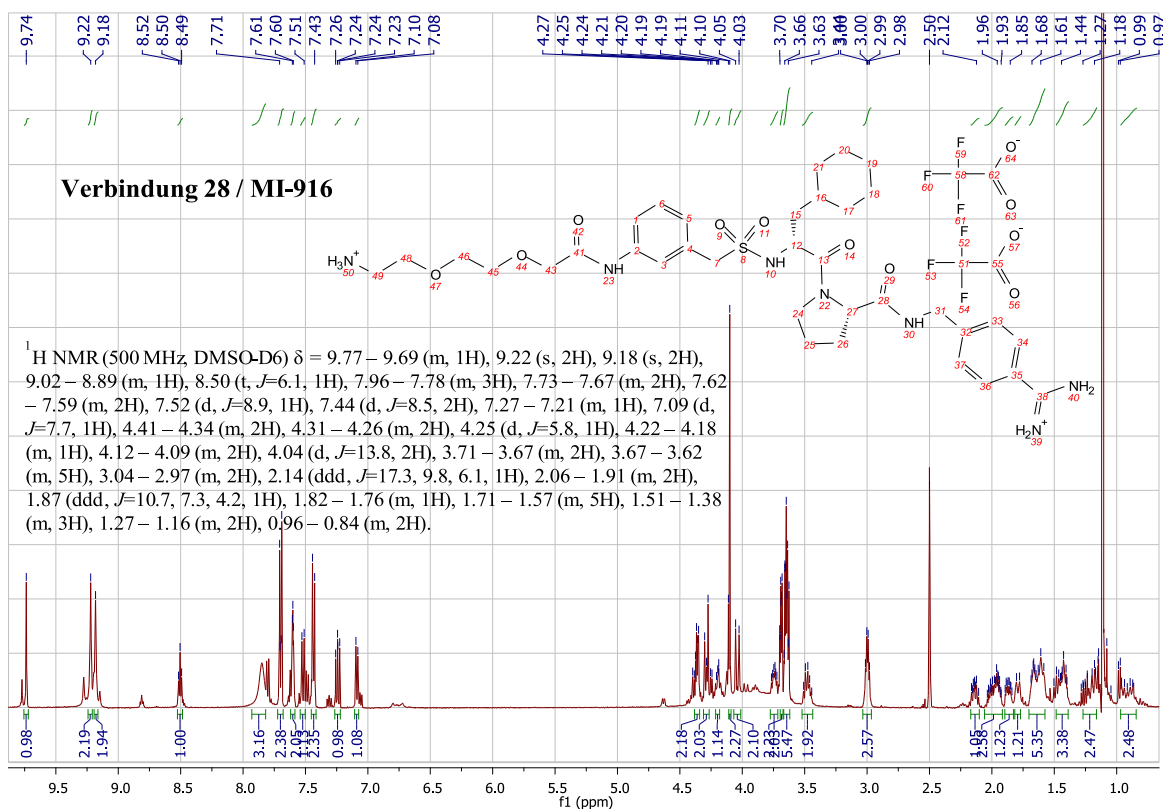
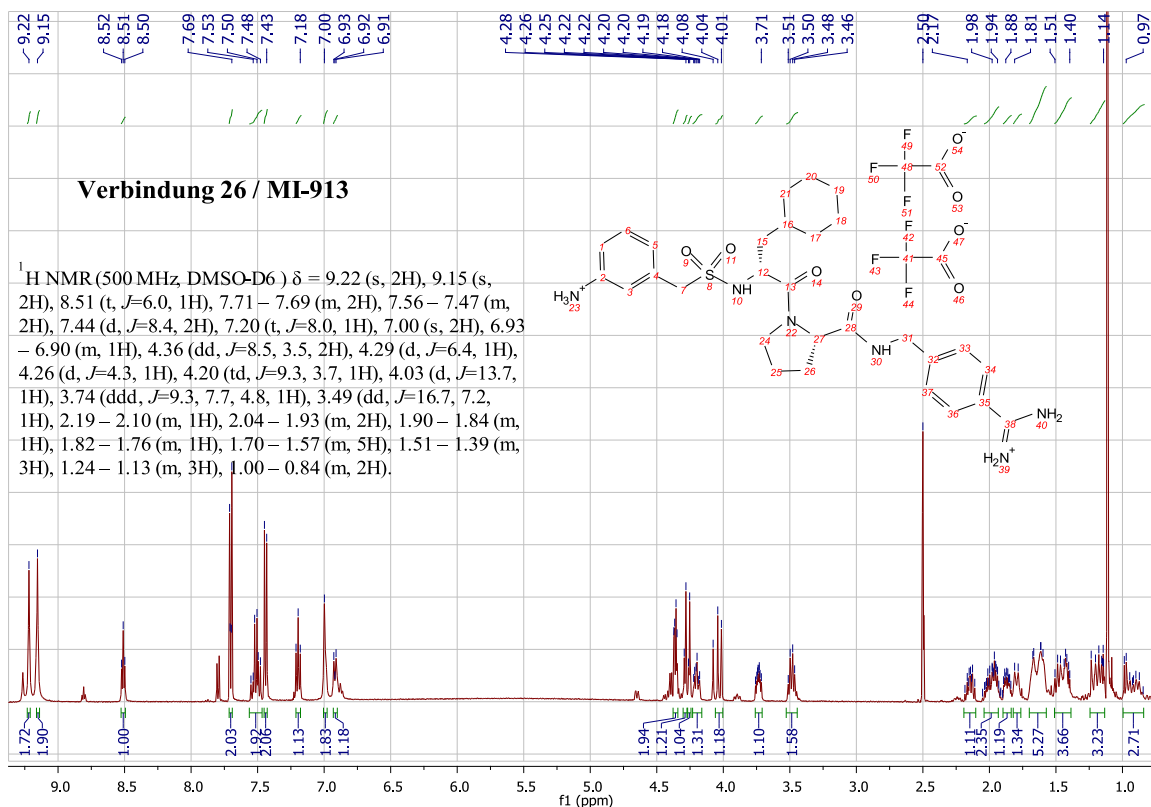












Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. Steinmetzer für die Möglichkeit danken, in seinem Arbeitskreis über ein interessantes und interdisziplinäres Thema meine Dissertation anfertigen zu können. Zudem danke ich ihm für die hervorragende fachliche Betreuung während der gesamten Zeit sowie für das ausführliche Prüfen und Korrekturlesen dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Bakowsky danke ich für die Bereitschaft, als Zweitgutachter zur Verfügung zu stehen sowie für die gute Zusammenarbeit bei der Fertigstellung dieses Forschungsprojektes. Herrn Prof. Dr. Kockskämper und Herrn Prof. Dr. Reuter danke ich für die Bereitschaft, in der Prüfungskommission mitzuwirken. Bei Frau Dr. Jana Brüssler bedanke ich mich für die konstruktive Zusammenarbeit bei der Herstellung und Charakterisierung der Liposomen. Gedankt sei auch Herrn Dr. Doru Vornicescu für seinen unermüdlichen Einsatz bei den SPR-Messungen.

Bei den ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises - Dr. Zouhair Hammami, Dr. Maya Hammami, Dr. Daniela Meyer, Dr. Kornelia Hardes und Alexander Maiwald - bedanke ich mich für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die angenehme kollegiale Arbeitsatmosphäre. Dem Trio im Büro B203, Aline Keils, Jenny Kouretova, Anton Epp, danke ich für die schöne gemeinsame Zeit, vor allem für die gut organisierten Weihnachtsfeiern 2014 und 2015; ihr habt frischen Wind in die Arbeitsgruppe gebracht und zur Verbesserung des Arbeitsklimas wesentlich beigetragen. Bei den „Newcomern“ des Arbeitskreises, Teodora Ivanova, Benjamin Wenzel und Dorothee Rogge, bedanke ich mich für die angenehme Zeit.

Ein großes Dankeschön geht auch an Heike Lang-Henkel für die Unterstützung bei Fragen zur Enzymkinetik. Den Praktikanten Abiye Dula und Markus Lechner danke ich für die hilfreiche Mitarbeit bei den enzymkinetischen Messungen.

Nina Zitzer möchte ich hier für die Aufnahme der Massenspektren und Stefan Newel für die NMR-Messungen danken.

Ganz besonders danke ich an dieser Stelle den Menschen in meinem privaten Umfeld, die jederzeit an mich geglaubt und die mich in meinem Vorhaben bestärkt haben: meinen Familienangehörigen, meiner Freundin und meinen Freunden.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Synthese neuartiger Thrombinhemmstoffe zur Entwicklung gerinnungshemmender
Liposomen“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den.....

.....